

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA MICROBIOLOGIE DU SOL

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

SUR LA DÉGRADATION DE LA CELLULOSE DANS LE SOL

Par S. WINOGRADSKY.

(Avec les planches n^o V-VIII).

Clichés de M. JEANTET, microphotographe de l'Institut Pasteur.

De tous les phénomènes microbiens, la dégradation de la cellulose est celui qui s'impose le plus par la masse énorme du produit à dégrader et par la résistance exceptionnelle de ce produit aux actions chimiques.

Aussi a-t-il attiré l'attention des chimistes et des botanistes dès avant Pasteur et le début de l'ère microbiologique.

Tout naturellement, les observations ont porté en premier lieu sur la fermentation anaérobie, mode de destruction le plus apparent, dont les macérations des matières végétales, les marais, les tas de fumier, sont le siège et qui attiraient l'attention par un dégagement de gaz combustibles et de produits malodorants.

Les recherches de Mitscherlich, Gayon, Déhérain, Trécul,

van Tieghem, Popoff, Hoppe-Seiler, Tappeiner, Van Senus, qui s'y rapportent, ont été si souvent citées et commentées qu'il serait inutile d'y revenir.

Les études magistrales du regretté Omeliansky sur les bacilles des fermentations hydrogénique et forménique de la cellulose ont définitivement orienté les idées dans cette direction ; de sorte que ce processus fut considéré longtemps comme le mode de destruction sinon exclusif, du moins dominant dans la nature.

Deux travaux seulement, durant le premier quart de ce siècle ont paru porter atteinte à cette manière de voir : celui de Itersohn (1903) et celui de Hutchinson en collaboration avec Clayton (1919) dont il sera question dans la revue critique qui suit, sans réussir pourtant à donner une idée adéquate de l'importance des processus aérobies dans ce cas.

« Sans doute, concluait Pringsheim en 1923 (1), ce dernier processus doit avoir aussi son importance dans la nature, mais non la grande importance de la décomposition anaérobie » : opinion très répandue et même probablement dominante jusqu'à ce jour, particulièrement parmi les chimistes.

Il ne sera pas difficile de prouver que c'est le contraire qui est vrai. L'opinion opposée apparaît déjà comme bien probable si l'on songe que la décomposition anaérobie n'est liée qu'à des conditions toutes spéciales, qui sont réalisées dans les cas de matière végétale noyée dans l'eau, ou bien en masse humide et compacte, ou enfin, emmagasinée dans les intestins des animaux, tandis que le phénomène aérobie est en cours sur toute la surface du sol, partout où la matière végétale et le minimum d'humidité nécessaire ne font pas défaut dans ce milieu si parfaitement aéré.

C'est donc l'étude de la dégradation aérobie de la cellulose qui intéresse de préférence la microbiologie du sol. Bien plus, le problème est à la base même de cette branche de la microbiologie. En effet, les protides et les saccharides ne jouent dans le sol qu'un rôle effacé comme source d'énergie, bien inférieur en tout cas à celui des matières qui composent le squelette végétal, dont la cellulose peut être considérée comme la partie

1. *Die Polysaccharide*, Berlin, 1923, p. 78.

qualitativement et quantitativement la plus importante. Aussi est-on tenté de croire que c'est dans celle-ci que *la vie du sol* trouve sa source principale d'énergie. Largement approvisionné et incessamment en cours, ce processus ne saurait rester, d'un autre côté, sans répercussions sur le milieu naturel qui en est le siège multimillénaire; et ce serait un second aspect du même problème qu'il s'agirait d'étudier.

Le problème est vaste. Il se complique par le nombre et la variété des agents actifs et, comme on le verra, par la multiplicité de leur action.

On sait qu'ils appartiennent principalement à deux grands groupes, ceux des bactéries et des champignons, dont les activités paraissent bien enchevêtrées dans tous les lieux où s'accumule la matière végétale morte. Le caractère si différent de ces organismes, qui se traduit dans les modalités différentes de leur action, rend cependant préférable d'étudier ces groupes d'agents à part. En conséquence, le sujet de ce mémoire n'est limité qu'aux recherches sur les bactéries en question. On ne touchera aux champignons, réservés pour un prochain mémoire, qu'en passant.

Pour ne pas trop compliquer le sujet, on se bornera à l'étude de la dégradation de la cellulose fibreuse, seule, sous sa forme naturelle la plus pure, telle que fibres de coton et de lin, en se servant de préférence de papier à filtrer et de tissu de coton.

Le présent mémoire ne résumera que les premières recherches sur ce thème précisé, qui reste encore bien vaste, malgré nos limitations; il n'a aucunement la prétention d'en présenter une étude complète.

Pour caractériser les espèces nouvelles ou peu connues, représentatives de tout un groupe bien spécial, on a concentré les observations sur leur culture dans un milieu à cellulose fibreuse dans des conditions aussi simples que possible.

La technique courante ayant fait faillite dans ce cas, on a été forcé d'élaborer une technique spéciale pour arriver à différencier les espèces et à étudier leurs fonctions. Cette technique sera décrite en détail.

En général, l'un des buts principaux de ce mémoire n'est pas tant de présenter une caractéristique aussi complète que possible de microbes nouveaux, que de proposer une méthode à

appliquer à ce groupe, méthode qui en permettrait l'étude suivie, unifiée en quelque sorte, au lieu d'observations, si rares du reste, et d'un caractère plutôt épisodique, qui ont paru jusqu'à ce jour.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.

En laissant de côté le processus anaérobie, avec ceux qui sont liés la dénitrification et à l'action des thermophiles, il ne reste que bien peu de travaux à passer en revue.

C'est à Van Iterson jr. (1) qu'on attribue généralement le mérite d'avoir attiré l'attention des microbiologistes sur le fait, pourtant bien patent, que la décomposition de la cellulose a bien lieu, non seulement à l'abri de l'air, mais aussi à son accès, et cela encore bien plus énergiquement. Le papier à filtrer infecté avec de la terre ou du limon se couvrait, au bout de quatre à cinq jours, de taches jaunes ou brunes, en se transformant en pulpe. On y trouvait une multitude d'organismes variés, où un bâtonnet court et un coceus paraissaient dominer à tel point que l'auteur fut amené à attribuer au bâtonnet, désigné du nom de *B. ferrugineus* le rôle d'agent actif, tandis que le coceus fut considéré comme favorisant le processus d'une manière non précisée. Mais quand l'auteur entreprit d'isoler les organismes de ses cultures brutes ou d'enrichissement, tous ses efforts restèrent vains. Jamais comme il l'avoue, la décomposition du papier ne put être reproduite au moyen des cultures pures, qu'il avait réussi à isoler du milieu original, où ce phénomène était pourtant si prononcé. En présence de cette difficulté, l'auteur abandonna la tâche et dirigea ses recherches vers les champignons destructeurs de la cellulose, plus facilement différenciables.

Ce n'est qu'en 1912 que la question fut reprise par Kellerman, et ses collaborateurs Mc Beth, Scales et Smith (2). Ces

1. *Centralblatt f. Bakteriologie*, II, 11, 1904, p. 689-698.

2. KELLERMAN et MAC BETH, The fermentation of cellulose, *Centr. Bakt.*, II, 34, p. 485-494, 1912.

MAC BETH et SCALES, U. S. Dep. Agr. Bureau of plant industry, *Bull.*, 266, 1913.

KELLERMAN et MAC BETH, SCALES et SMITH, Identification et Classification of, cellulose dissolving bacteria. *Centr. Bakt.* II, 39, p. 502, 1913-1914.

SCALES, *Ibidem*, 44, p. 661, 1915.

recherches, très étendues, qui ont duré plusieurs années, auraient apporté, selon l'avis des auteurs, une solution définitive au problème de la décomposition de la cellulose dans la nature.

Une trentaine d'espèces de bâtonnets minuscules ont été isolés, toutes *n. sp.*, et leurs caractères culturaux minutieusement décrits sur non moins que 22 milieux bactériologiques. Ils y pullulaient bien, particulièrement sur la gélose amidonnée, mais quant au point cardinal, c'est à dire leur pouvoir d'agir sur la cellulose, on ne trouve parmi les observations des auteurs aucun fait qui puisse l'établir d'une manière concluante.

Un nouveau milieu est à la base de leur procédé : la gélose cellulosée, constituée par une suspension d'un précipité cellulosoique additionné de sulfate d'ammoniaque et de sels minéraux, gélifiée par de la gélose. Le procédé consiste à dissoudre du papier à filtrer dans la liqueur cupro-ammoniacale et à précipiter avec de l'acide chlorhydrique ; ou bien, à le dissoudre dans de l'acide sulfurique concentré et le précipiter avec un excès d'eau. Ce milieu devait servir à isoler les bactéries qui pullulent dans les cultures brutes et à en sélectionner en même temps celles qui manifestaient une action dissolvante sur le précipité cellulosoique, enrobé dans la gélose. On y a vu paraître, entre autres, de petites colonies ceinturées de fines zones diaphanes n'excédant pas 1-2 millimètres de largeur, et ce sont les espèces qui les formaient auxquels les auteurs n'hésitèrent pas à attribuer une action enzymatique sur la cellulose et à les qualifier d'agents bactériens de la décomposition de la cellulose dans le sol.

Il serait inutile de revenir sur les controverses qui ont eu lieu concernant la valeur démonstrative de ces zones, du moment qu'il n'existe aucun moyen pour décider s'il y a vraiment dissolution ou seulement un simple refoulement du fin précipité amorphe par la colonie au sein de la gélose, peut-être ramollie sous son action. Il n'est que trop évident, de plus, que le seul moyen de prouver une action est de donner la mesure de l'effet qui en résulte. Les auteurs ne disent pas avoir même tenté une expérience de ce genre. Ils insistent, par contre, sur le fait que ce pouvoir se perd très facilement ; autrement dit, que les cultures sur les bouillons divers en étaient dépourvues.

Mais en admettant même, avec les auteurs, que les zones

claires sont l'expression d'une action enzymatique sur le précipité englobé dans la gélose, s'ensuit-il que les colonies qui les produisent sont capables de dégrader la cellulose fibreuse, ce produit naturel si résistant qu'ils trouvent dans le sol? Comme nous l'apprend la chimie de la cellulose, il n'existe pas de solvant pour ce produit, qu'il est par conséquent impossible de régénérer sans altération. L'altération, dans le cas de la liqueur cupro-ammoniacale ne serait que physique, comme on le croit, équivalant à une dépolimérisation de la molécule complexe de la cellulose fibreuse; elle est, par contre, bien chimique sous l'action de l'acide sulfurique concentré. Ni dans l'un, ni dans l'autre cas il n'est permis d'identifier le précipité, dont se sont servis les auteurs, à la cellulose fibreuse naturelle. D'autant plus que, dans le cas de la dégradation naturelle, il s'agit non seulement d'un effet purement chimique, mais aussi d'une adaptation biologique, comparable à des cas de parasitisme, qui doit entrer en jeu pour l'attaque de corps organisés insolubles, à structure complexe.

A tout prendre, la conclusion s'impose que les auteurs n'ont réussi à isoler que quelques commensaux des fermentations aérobies de la cellulose, soit des représentants de la flore dite secondaire qui accompagne toujours les microbes spécifiques, tandis qu'ils ont complètement échoué dans leurs recherches des vrais ferment.

Ce résultat négatif, qu'il importe de mettre bien en relief — ces recherches ayant tenu une place assez large dans le chapitre de la décomposition de la cellulose durant de longues années — est tout de même intéressant à noter, comme démonstration du fait qu'il est impossible d'arriver au but dans ce cas par l'application la plus soigneuse des méthodes courantes, qui sont calquées sur les propriétés des microbes protéolytiques et glucolytiques, de préférence.

Le premier jalon dans ce problème, après tant d'années de stagnation complète, a été posé en 1919 par le travail remarquable de Hutchinson et Clayton, fait à Rothamsted (1).

(1) N. B. HUTCHINSON et I. CLAYTON, On the decomposition of cellulose by an aerobic organism (*Spirochæta Cytophaga n. sp.*) *The Journal of Agricultural Science*, vol. IX, p. 143-173, 3 planches, 1919.

L'organisme isolé par eux du sol de la célèbre Station agronomique, nommé *Spirochæta Cytophaga* s'est révélé comme un agent aérobio des plus énergiques de la dégradation de la cellulose fibreuse, fonction qui s'est montrée strictement spécifique.

Si on se demande la raison de leur succès, on la trouve facilement dans leur procédé qui visait, dès le début, à la spécificité de la fonction et prenait par conséquent soin de ne jamais s'écartier du milieu électif.

En cela, ils n'ont fait que suivre l'exemple d'Oméliansky, dont le travail d'il y a plus de trente ans s'était inspiré du même principe. Les germes étrangers qu'il constatait en petite quantité dans les cultures ne l'ont pas empêché, comme on le sait, de faire une étude complète des bacilles spécifiques, en tout point confirmée par les recherches ultérieures. De même les auteurs anglais, avec la différence pourtant qu'ils croyaient leurs cultures pures, tandis qu'elles ne l'étaient pas non plus, comme on le verra dans la suite. Des faits de ce genre, qui enseignent que l'étude des microbes spécifiques n'est pas rendue impossible par la présence de la « mauvaise herbe » bactérienne réduite à peu de chose, — à condition toutefois de ne pas s'écartier du milieu électif, — on en trouvera un certain nombre dans les pages qui suivent. Bien entendu, aussitôt que l'on passe aux milieux bactériologiques courants dans le but de faire ressortir *toutes* les réactions du microbe, plutôt potentielles qu'actuelles dans le cas d'organismes spécifiques, le tableau, si clair auparavant, se brouille et on perd la piste, ce qui est arrivé justement, comme nous l'avons vu, à Kellerman et ses collaborateurs.

Pour éviter toute redite, on examinera les données du mémoire en regard de nos propres résultats, concernant cet organisme, ou plutôt ce groupe d'organismes que nous désignerons par le nom de *Cytophaga*, en faisant un nom générique du nom spécifique original ; on en verra les raisons.

L'important travail de Hutchinson et Clayton n'a pas trouvé de continuateurs et n'a pas attiré, en général, toute l'attention qu'il méritait. On ne le trouve même pas cité dans plusieurs traités parus entre 1919 et 1926. Les recherches publiées entre temps ne s'en sont pas davantage inspirées.

Ces recherches, notamment celles de Groenewege (1), de Sack (2), de Gray et Chalmers (3), laissent toutes la même impression : celle de la difficulté de séparer et de différencier les mélanges bactériens qui pullulent dans les milieux contenant de la cellulose. Les auteurs n'apportent aucune méthode qui pourrait faciliter cette différenciation, ni des caractéristiques assez précises des organismes qu'ils disent avoir isolés, pour être sûr qu'il ne s'agit pas d'un mélange de plusieurs espèces hétérogènes contenant entre autres telle ou telle autre espèce agissant sur la cellulose.

C'est particulièrement le cas du travail de Gray et Chalmers sur *l'action stimulante de certains composés organiques sur la décomposition de la cellulose par un nouveau microorganisme aérobio qui attaque la cellulose ainsi que l'agar*, qui prétendent avoir isolé, — sans dire un mot de leur manière de faire — un microbe appelé *Microspira agar-liquefaciens*, qui serait capable de liquéfier la gélose et en même temps de décomposer rapidement la cellulose. Nullement spécialisé, ce microbe donnerait facilement des cultures sur bouillon de viande, sur gélatine et gélose nutritives, etc. Sous son action, le papier immergé dans une solution minérale subirait une désagrégation, mais, ensemencé en stries sur du papier étendu sur gélose, le microbe n'y donnerait aucune culture. Quant à l'action stimulante de certains hexoses et pentoses sur le processus, qui paraît résulter de deux séries d'expériences, on la voit se transformer en action entravante dans une troisième, sans que les conditions soient essentiellement différentes. Il serait difficile de trouver une autre explication de ces contradictions que celle qui résulte d'un mélange varié qui donne, comme on le sait, des actions toujours bien instables. Si l'on ajoute que les figures schématiques de la planche, où l'on voit des bâtonnets ou vibrions à flagelles avec des spirilles et des coccus sur fibres, ne donnent aucune idée du tableau microscopique que présente la culture, on est obligé de conclure que l'existence de ce nouveau microbe, tel qu'il est décrit, est bien sujette à caution.

(1) *Bull. Jardin botanique Buitenzorg*, III, 2, p. 261, 1920.

(2) *Centr. Bakt.* II, 62, p. 77, 1924.

(3) *Ann. Applied Biology*, 11, p. 324, 1924.

Les débuts de nos recherches sur le sujet de ce mémoire datent de 1925. En étudiant les méthodes de la microbiologie du sol que nous avons basée en partie sur l'emploi obligatoire du silico-gel, nous nous sommes assurés que l'application de ce milieu, ensemencé avec des grains de terre, permet d'isoler du sol avec une grande facilité le microbe de Hutchinson et Clayton, encore si peu connu dans les laboratoires. Aussi avons-nous recommandé cette méthode comme rendant les meilleurs services, quand il s'agit « surtout de cellulose » (1). Ces premières observations ont été résumées dans une note parue en octobre 1926 (2).

Un milieu à silico-gel, préparé par un procédé quelque peu différent, a été employé pour le même but par Bojanovsky (3) en 1925 et par Waksman (4) en 1926. Ce dernier savant apprécie surtout la méthode d'ensemencer le gel recouvert d'une couche de cellulose fibreuse avec des petits grains de terre, comme très utile pour démontrer la présence et la nature de bactéries capables d'agir sur la cellulose, en l'espèce de *Spirochæta cytophaga* H et C; fait qui lui suggère la juste idée que « seuls les milieux spécifiques et électifs sont désirables pour la démonstration, l'isolement et l'étude de ces bactéries ».

Comme on le voit, l'introduction de ce simple milieu a déjà dirigé les recherches sur la bonne voie en démontrant que le microbe de Rothamsted, auquel ses auteurs mêmes étaient plutôt enclins à attribuer un rôle bien modeste (*a somewhat subordinate role*) est bien ubiquitaire, et qu'il y a par conséquent des raisons de compter avec son activité dans tous les sols.

En suivant ces recherches, toujours au moyen de la même méthode, nous nous sommes assurés bientôt de la multiplicité des bactéries aérobies ayant pour fonction la dégradation de la cellulose fibreuse et nous en avons distingué provisoirement deux groupes : 1^o les *Cytophagas*; 2^o les *Vibrions*, que nous avons brièvement caractérisés. Ces observations ont été résumées

(1) Étude sur la microbiologie du sol, 1^{er} mémoire. Ces *Annales*, 34, n° 4, avril 1925, voir p. 353.

(2) Sur la décomposition de la cellulose dans le sol, *C. R.* 183, 1926, p. 691.

(3) *Centr. f. Bakter.*, II, 64, p. 222, 1925.

(4) The use of the silico-gel plate for demonstrating the occurrence and abundance of cellulose decomposing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 12, n° 2, août 1926.

dans une note présentée à l'Académie des sciences en février 1927 (1).

Dans une troisième note, nous avons tenté une caractéristique générale de l'action chimique de tous ces organismes spécifiques sur la cellulose fibreuse (2).

Pour terminer, mentionnons les importantes recherches de Waksman et de son école (3), qui ont contribué à nos connaissances sur la marche du phénomène dans le sol même et sur les conditions qui le régissent. Sa marche était suivie 1^o par le dosage de l'acide carbonique exhalé; 2^o par le dosage de la cellulose détruite. Les expériences ont conduit à la conclusion, que le processus apparaît en premier lieu comme fonction de l'azote assimilable dans le sol, lequel contient toujours les agents microbiens actifs, mais dont l'action ne peut s'exercer qu'en présence de cet azote.

Quant aux agents du processus, les recherches de Waksman n'ont porté au début que sur l'activité comparée des trois classes d'organismes habitant le sol : des champignons, des bactéries, des actinomycètes, sans viser quelque espèce déterminée. On étudiait la part qu'ils prennent au processus en dénombrant les pullulations qui se déclenchaient à la suite de l'addition du papier à la terre. Les premières observations dans cette direction ont conduit ce savant à conclure au rôle prépondérant des champignons, tout en faisant des réserves sur le milieu qu'il employait pour le dénombrement des bactéries et qui était dans ce cas de la gélose albuminée. Les observations ultérieures, consécutives à l'emploi du silico-gel, sont moins affirmatives dans ce sens, et on y trouve les bactéries aérobies placées à côté des champignons comme agents actifs, les actinomycètes ne travaillant que dans des cas où les deux premiers groupes sont réduits à l'impuissance, dans un sol trop sec (4).

(1) Recherches sur la dégradation de la cellulose dans le sol, *C. R.*, **184** 1927, p. 493.

(2) Sur l'oxydation de la cellulose dans le sol, *Ibidem*, **187**, 1928, p. 326.

(3) WAKSMAN et SKINNER. Microorganisms concerned in the decomposition of cellulose in the soil. *Journ. of Bacteriology*, **12**, 1926, p. 57; WAKSMAN, Cellulose and its decomposition in the soil by micro-organisms. *Proceedings of the Intern. Soc. of Soil Science*, **2**, 1926, p. 293.

(4) WAKSMAN et DUBOS, *C. R.*, **185**, 1927, p. 1226.

René DUBOS, Influence of environmental conditions on the activities of cellulose decomposing organisms in the soil, *Ecology*, **9**, n° 1, 1928, p. 12.

Enfin, dans une récente note, René Dubos (1) résume les résultats d'un travail fait sous la direction de Waksman, où l'on trouve une brève caractéristique de cinq microbes nouveaux isolés de différents sols en même temps que le *Sp. cytophaga*.

TECHNIQUE.

Sous cette rubrique, on traitera des méthodes appliquées à tout le groupe, concernant :

- 1° Le milieu électif et les milieux auxiliaires;
- 2° Les cultures spontanées;
- 3° La différenciation et la séparation des souches;
- 4° Les méthodes de coloration et d'étude morphologique;
- 5° Les méthodes chimiques.

Malgré la simplicité du procédé, on apportera toutes les précisions, les détails de la manipulation n'ayant que trop souvent, comme, on le sait, une importance majeure en Microbiologie.

MILIEU ÉLECTIF. — Du silico-gel dans des boîtes Pétri de 10 et de 20 centimètres de diamètre, imprégné de sels minéraux, couvert ou enduit de matière cellulosique, est le seul milieu dont on se sert pour les repiquages des lignées.

Il n'y a rien à dire sur le mode de préparation du gel, décrit ailleurs, si ce n'est qu'il est préférable d'éviter les « perfectionnements » apportés à notre procédé, notamment ceux qui visent à une coagulation rapide ou qui ont pour but de se passer d'un long lavage. Une expérience déjà longue nous a montré notamment qu'une gélification lente (vingt-quatre heures et plus), en présence d'un excès d'acide, suivie d'un long lavage à l'eau froide, puis à l'eau chaude, qui enlève avec l'acide chlorhydrique et les chlorures les composés siliciques solubles, est la méthode la plus sûre pour avoir un gel résistant, durable et se prêtant au procédé analytique que nous avons adopté.

Quant à la solution dont le gel est imprégné pour devenir un milieu de culture, trois points sont à considérer : 1° sa réac-

(1) R. DUBOS, The decomposition of cellulose by aerobic bacteria. *Journ. of Bacteriology*, 45, n° 4, avril 1928, p. 223.

tion; 2^o l'azote nécessaire; 3^o la forme de la cellulose à offrir.

Déjà Hutchinson et Clayton ont noté que la gamme des réactions permettant la pullulation des *Cytophaga* est très étendue; que l'on obtient des végétations à des réactions franchement acides ou alcalines, correspondant, disent-ils, à $\text{HCl N}/50$ d'un côté, $\text{NaHO N}/55$ d'un autre, comme limites. En effet, il n'est pas difficile de s'assurer que les *Cytophaga* et les *Vibrions* sont capables de donner des cultures sur un milieu à réaction acide. Mais nous n'avons jamais eu de succès dans nos efforts de conduire les lignées de cultures à un *pH* au-dessous de 7,0. Tôt ou tard la dégénérescence se faisait remarquer et les repiquages finissaient par rester stériles; tandis qu'au contraire, en réglant le *pH* à environ 7,2 et au-dessus, les lignées restaient indéfiniment luxuriantes en conservant bien leurs caractères.

Remarquons que le *pH* initial est modifié par la culture et que c'est l'assimilation des ions azotés qui en est la raison principale; le *pH* du gel s'élève quand l'azote est présenté sous forme de nitrate alcalin; il tombe avec le sulfate d'ammoniaque.

Quant à la cellulose, l'usage a consacré depuis longtemps le choix du papier à filtrer. Son usage est essentiel dans la technique que nous appliquons; les espèces du groupe l'attaquent énergiquement en produisant des taches colorées de teintes variées, qui sont leurs colonies. C'est l'aspect de ces végétations, leur teinte, leur manière de s'étendre sur le papier et d'en modifier la texture, qui fournissent un certain nombre de caractères macroscopiques, lesquels, joints aux caractères microscopiques, permettent de différencier les espèces en souches.

Mais pour en tirer tous les avantages, il est nécessaire de l'employer intact, et non à l'état moulu ou en pâte, et mieux sous forme de filtres tout prêts, en se tenant à une marque déterminée, assez mince, à grains fins et de teinte blanche et non crème. Nous nous servons de filtres Durieux n° 111, blancs, de préférence de 70, 90, 150 millimètres de diamètre; leurs poids varient très peu, étant en moyenne respectivement 0,24, 0,45, 1,20, ce qui est pratique en permettant un dosage rapide de la dose offerte. L'humidité du papier dans les conditions ordinaires du laboratoire ne varie presque pas, se tenant tou-

jours un peu au-dessous de 7 p. 100 ; elle peut être admise à ce taux sans erreur sensible, ce qui dispense des dosages d'humidité.

Indispensable pour les observations morphologiques, le papier à filtrer est très avantageusement remplacé par des tissus de coton (percale, nansouk, batiste de coton, etc., bien entendu, libres de tout apprêt), quand il s'agit d'études chimiques. Le fait qu'il est facile d'en trouver qui soient exempts d'oxycellulose, tandis que le papier à filtrer en contient toujours, particulièrement les meilleures marques, est déjà un grand avantage. Un autre est celui que les chiffons attaqués se laissent très facilement enlever de la surface du gel, pour les remplacer, si l'on veut, par des neufs, qui subissent alors les effets de l'action bactérienne de plus en plus rapidement. On se sert dans ce cas d'une plaque de silico-gel de 20 centimètres de diamètre (voir formule, p. 563) qu'on garnit de 20-25 petits carrés de chiffons de 2-3 centimètres de côté, ce qui représente un poids d'environ 1 gr. 5. La méthode permet de suivre de près les effets de l'attaque bactérienne, et de se procurer plus facilement une provision de fibres oxydés.

Veut-on présenter la cellulose à l'état finement divisé ? Ce n'est pas le précipité recommandé par Kellerman qu'on emploiera, mais de l'hydrocellulose d'Aimé Girard, qui diffère le moins de la cellulose par sa composition chimique et sa structure.

Pour la préparer, on plonge du coton dans de l'acide sulfurique à 3 p. 100, on essore, on presse jusqu'à ce que la masse ne retienne que 35-40 p. 100 de son poids de liquide ; on sèche, puis on abandonne plusieurs heures à 40°, ou quatre heures à 70°. Plus rapidement on peut la préparer en fixant une allonge bourrée de coton au moyen d'un bouchon sur un ballon chargé d'un peu d'acide chlorhydrique concentré ; on chauffe légèrement jusqu'à ce que les vapeurs chlorhydriques commencent à sortir de l'allonge ; on arrête alors le chauffage et on laisse l'allonge environ une heure sur le ballon, puis on en retire le coton et on lave soigneusement. Le coton ainsi traité garde, comme on le sait, son apparence, mais il devient extrêmement friable, de sorte que, travaillé avec un peu d'eau dans un mortier, il donne un « lait » parfaitement homogène, à

sédimentation lente, qui est une suspension de débris de fibres à l'état de fine division, comme on s'en assure à l'examen microscopique.

On peut en enduire le silicogel, ou préparer avec lui une gélose cellulosée genre Kellerman. On en trouvera ci-après la formule. Ce milieu bactériologique, d'une blancheur et d'un brillant de porcelaine, très élégant d'aspect, n'a pas réalisé les promesses qu'on pouvait y attacher. Certaines des espèces que nous décrirons, ont refusé d'y pulluler ; d'autres y ont donné des végétations en colorant le milieu, mais sans former de colonies bien différenciées, et surtout sans laisser rien voir qui puisse éveiller l'idée de zones enzymatiques.

Pour terminer avec les milieux à cellulose, voici les formules et les détails de la manipulation.

On tient en réserve une solution minérale concentrée contenant, pour 200 cent. cubes d'eau distillée, en grammes :

Phosphate monopotassique	1,0
Sulfate de magnésie	0,5
Chlorure de sodium	0,5
Sulfate de fer.	0,01
Sulfate de manganèse	0,01

L'azote sous forme de nitrate de potasse pur et sec, est répandu, de préférence en poudre, directement sur la plaque, après pesage, où le sel ne tarde pas à disparaître.

Pour une plaque de 10 centimètres de diamètre préparée avec 30 centimètres du mélange silicate + acide à volumes égaux, on prend environ 5 milligrammes d'azote soit 36 de KNO_3 . On mélange dans une petite fiole modèle Fourneau de 50-60 cc. de contenance :

Solution de sels citée, en centimètres cubes	2
Carbonate de chaux, en grammes	0,02
Eau distillée; en centimètres cubes	10
Potasse à 2 p. 100, IV gouttes, ou quantité suffisante pour que le pH soit environ 7,2.	

On prend autant de fioles chargées qu'il y a de plaques. On peut en mettre jusqu'à une demi-douzaine sur un rond d'amiante et les faire bouillir toutes à la fois pendant environ cinq minutes; on jette ensuite le liquide en pleine ébullition sur les plaques et on les laisse ouvertes sur la plaque métallique de l'étuve Roux jusqu'à l'évaporation de la nappe liquide.

Les ronds de papier, enfermés dans une boîte de Petri, sont stérilisés à l'autoclave et tenus, jusqu'au moment de s'en servir, à l'étuve sur la plaque métallique. On les saisit au moyen d'une pince flambée et on les étend sur la surface de la plaque. Si la plaque est « séchée » à point, ils tardent à s'imbiber d'eau avant qu'on les presse ou les frotte pendant quelque temps au

moyen d'une spatule de porcelaine flambée; et c'est le meilleur signe que tout excès d'humidité est évité, ce qui est une condition nécessaire pour réussir la séparation.

Pour les grandes plaques, on prend :

Nitrate de potasse, en grammes	0,200
Carbonate de chaux, en grammes	0,100
Solution de sels, en centimètres cubes	10
Eau distillée, en centimètres cubes	30
Potasse à 2 p. 100, XX gouttes, ou quantité suffisante pour le pH indiqué.	

On presse sur la surface un rond de 150 millimètres.

Quand il est nécessaire de faire un grand nombre de repiquages, on facilite beaucoup le travail en disposant le papier sur la plaque en secteurs espacés en croix, comme on le voit sur la figure de la page 583. Si le gel et le papier sont bien débarrassés de tout excès d'humidité, les microbes sont incapables de franchir les détroits entre les secteurs, chaque plaque sert alors à quatre repiquages, remplaçant donc quatre plaques couvertes d'un seul rond. Il est vrai qu'un passage spontané est difficile à prévenir de temps en temps, mais l'économie de plaques est tout de même très considérable.

Veut-on se servir de chiffons au lieu de papier — après avoir isolé l'espèce ou l'association voulue — on se tient à la formule du gel pour les grandes plaques, dont on recouvre toute la surface par de petits carrés de tissus. On les fait bouillir quelque temps dans une capsule, puis on les applique en les retirant de l'eau sur les parois surchauffées de la capsule, pour les laisser s'égoutter un peu, en évitant pourtant cette fois de les sécher.

Quant à l'hydrocellulose, on n'oubliera pas, avant de l'utiliser pour les milieux de culture, que les fibres se laissent difficilement débarrasser d'acide par des lavages à l'eau. On commencera donc, si on ne l'a pas déjà fait pendant la préparation, par laver la portion pesée, sur un entonnoir Buchner muni d'un filtre de papier durci, avec de la soude à 1 p. 100, puis avec de l'eau chaude jusqu'à disparition de la réaction alcaline. Bien essorée, la masse est alors triturée par portions, en se servant d'un grand mortier et d'un pilon massif, dans la solution que voici :

Nitrate de potasse, en grammes	0,2
Carbonate de chaux, en grammes	0,1
Solution de sels, en centimètres cubes	10
Eau distillée, en centimètres cubes	100
Potasse à 2 p. 100, quantité suffisante pour pH 7,2.	

Pour ce volume, on peut prendre jusqu'à 5 grammes de ce coton, et on a alors un « lait » assez épais, que l'on additionne de 2 grammes de gélose.

La réaction doit être éprouvée une seconde fois après qu'on y a fait fondre la gélose.

Passant aux milieux dits *auxiliaires*, nous insistons sur le principe immuable de n'y tenter la culture d'une souche qu'après s'être assuré, au moyen de la culture sur le milieu standard, de son action dégradante bien mesurable sur la cellulose fibreuse;

cette période sera suffisamment longue pour la différencier des commensaux et pour bien fixer ses caractères. Ce n'est qu'alors que viendra le moment de voir si elle agit sur des substances autres que la cellulose : peptone, glucose, amidon, gomme, hémicellulose (de la gélose). Dans le cas positif, on aura un moyen sûr pour mener à bout l'isolement à l'état de pureté complète, ce qui est toujours utile sans être absolument nécessaire, à condition de se tenir à la méthode que nous recommandons.

Remarquons tout de suite que la culture sur ces milieux gélosés sans cellulose ne réussit que pour une infime minorité de ces organismes.

On a cru pouvoir se borner aux cinq formules qui suivent :

1^o Gélose à peptone (milieu T) :

Peptone, en grammes	4
Glucose, en gramme.	0,2
Chlorure de sodium, en grammes.	0,5
Eau distillée, en centimètres cubes	100
Gélose, en grammes.	2

Alcaliniser jusqu'à virage rose avec la phthaléine du phénol.

2^o Gélose amidonnée. On prend 10 grammes d'amidon qu'on laisse bouillir dans la solution de sels ainsi composée pour un litre :

	GRAMMES
Sulfate d'ammoniaque.	4,5
Phosphate de potasse	1,0
Sulfate de magnésie.	0,5
Chlorure de sodium.	0,5
Carbonate de chaux.	1,0

On gélifie avec 20 grammes de gélose et on ajuste la réaction jusqu'à une teinte franchement bleue du bleu de bromothymol.

3^o Gélose glucosée : 10 grammes de glucose, le reste sans changement.

4^o Gélose gommée : 10 grammes de gomme adragante en poudre. Le rest comme ci-dessus.

5^o Gélose et sels minéraux sans autre addition.

On remarquera que nous ne faisons aucun usage des milieux liquides, ce qui appelle nécessairement quelques explications; car on se rappelle que le milieu qu'on employait exclusivement pour les cultures dites d'enrichissement, ainsi que pour les expériences quantitatives, était une solution de sels minéraux avec de l'azote sous forme de sel ammoniacal ou de peptone tenant immersés des bouts de papier à filtrer. Récemment

encore, Dubos (*loc. cit.*) recommande une méthode d'isolement basée sur l'emploi d'un milieu analogue : il ne s'agirait que d'exécuter une série d'ensemencements à divers degrés de dilution dans des tubes d'essai chargés de la solution minérale et d'une bande de papier, pour isoler ces microbes en culture pure, ce qui serait ici bien facile (*loc. cit.*, p. 228). Pour ce qui est des cultures « pures », en général, et des idées qu'on s'en fait souvent dans des cas pareils, on trouvera quelques remarques critiques tout à l'heure. Sans discuter donc à ce moment les chances d'y arriver par le procédé recommandé, nous irons jusqu'à condamner tout emploi du milieu liquide dans ce cas, et cela pour de multiples raisons.

1^o Toute immersion est extrêmement défavorable pour ces microbes, qui sont sensibles à l'accès de l'air à un degré peu banal. On verra que même l'épaisseur d'une mince feuille de papier gêne l'oxydation des fibres de la surface inférieure tournée vers le gel. Le fait suffit pour faire comprendre l'erreur que l'on commet en choisissant ces conditions peu électives pour les premières cultures d'enrichissement. La tâche n'en devient que plus compliquée à cause des pullulations variées qui en résultent (surtout dans un milieu peptoné), tandis qu'il n'est guère difficile de trouver les espèces actives directement dans le sol à un état beaucoup plus pur.

2^o Les pullulations se faisant aux dépens d'un corps insoluble, ce n'est pas le liquide, mais les fibres qui en sont le siège. Aussi en sont-elles littéralement tapissées. Un contrôle microscopique des cultures, très suivi, étant indispensable pour conduire les lignées, on conçoit à quel point il est plus efficace, exercé sur une feuille étalée sur un milieu solide, que sur un bout de papier immergé dans du liquide.

3^o Les cultures liquides ne peuvent présenter aucun caractère qui puisse aider à la différenciation des espèces ou souches. Si l'on n'a pu constater jusqu'ici rien de plus que la flétrissure du papier et sa désagrégation en pulpe — processus de « décomposition » décrit dans des termes toujours les mêmes, sans jamais saisir les caractères différents dus à l'action de différentes espèces —, c'est bien à l'emploi du milieu liquide qu'il faudrait l'attribuer.

Voilà les considérations qui conduisent à bannir le milieu

liquide dans ce cas, pour n'utiliser que des plaques, même pour des expériences quantitatives.

LES CULTURES SPONTANÉES. — Sous le terme *culture spontanée* nous avons entendu, dans un mémoire antérieur, *la pullulation d'un microbe dans la terre même qui l'héberge*, à la suite d'une addition de substance énergétique. Essayé dans le cas présent, le procédé a présenté des difficultés qu'il a été impossible de surmonter jusqu'ici, qui s'opposent en tout cas à son emploi courant : c'est que l'addition de cellulose à la terre provoque des pullulations très variées de petites formes trop difficiles à différencier, accompagnées en outre par un développement considérable de mycéliums, qui rend la tâche encore plus malaisée.

On réussit beaucoup mieux en raréfiant, pour ainsi dire, les particules de terre, *les grains*, en les espaçant sur le rond de papier du milieu standard. Il est vrai que, dans ce cas, il est difficile de parler de culture au sein de la terre; cependant le dépôt de terre, relativement abondant, sur ce milieu électif, en contact immédiat avec l'air, imite si bien les conditions naturelles qu'il est à croire que les choses s'y passent comme dans le sol, mais en quelque sorte au ralenti, à cause de la raréfaction du milieu. C'est en ce sens que ce genre de culture peut être désigné, lui aussi, sous le nom de culture spontanée.

La technique en est élémentaire. Au moyen d'une baguette de verre effilée, on attrape les grains de l'échantillon et on les dépose sur le papier en les espaçant de 1 à 1 cent. 5; sur un rond de 70 millimètres on en place environ 25; en prenant un rond de 90 millimètres, qui couvre toute la surface du gel de la plaque, on peut aller jusqu'au double. Maintenues à 30°, les plaques laissent voir, souvent déjà au bout de quarante-huit heures, des zones colorées ayant les grains pour centres.

Ce genre de culture si simple, dont on voit un exemple assez typique reproduit d'après nature sur la planche en couleur (pl. V, fig. 14), est appelé à rendre des services multiples dans les recherches sur le sort de la cellulose dans le sol. C'est ui qui est le meilleur début. On ne saurait le remplacer par aucun autre, qui puisse sélectionner les microbes spécifiques du milieu naturel avec la même rapidité et sûreté. Ils s'y

révèlent d'emblée avec les caractères macroscopiques et microscopiques qui serviront à leur différenciation ; mieux que cela, ils s'y différencient spontanément, en envahissant des zones différentes, où ils dominent à tel point que souvent le premier coup d'œil suffit pour reconnaître l'agent actif de la modification des fibres sur une zone donnée.

Sur la planche en couleur, le dessinateur a reproduit plus d'une douzaine de teintes (fig. 1-12, 3, 15, 17) que prennent les zones envahies, et ce n'est pas encore toutes.

Dominent généralement les teintes jaune terne, ocre, brun clair ; les teintes brillantes, rose, orange, jaune d'œuf, vertes apparaissent assez régulièrement ; les teintes brun foncé et noires sont plus rares avec le sol arable et surtout plus lentes à paraître.

Il est, bien entendu, presque impossible de reproduire ces teintes avec une entière fidélité par l'aquarelle, surtout en tenant compte des caractères, tels que couche mate ou brillante, opaque ou diaphane, etc. De plus, l'intensité des teintes varie avec l'âge de la culture, de sorte qu'une culture très jeune n'est colorée que faiblement et ne prend sa teinte définitive qu'en mûrissant. Néanmoins, ces échantillons de coloris seront bien utiles quand il s'agira de décrire les souches, dont la couleur forme un caractère important de diagnostic. On n'y parviendrait que malaisément par description verbale.

Le fait que ces zones colorées sont l'expression d'une certaine répartition ou localisation des espèces agissant sur les fibres facilite très sérieusement l'orientation des premières recherches. Il n'est pas rare que le peuplement d'une zone se présente d'emblée presque pur, ne laissant découvrir des formes étrangères que si l'on se met à les chercher. On en aura une idée en examinant les photogrammes pl. VI n° 2, pl. VII n° 5, pl. VIII n° 3 reproduisant l'aspect microscopique de ces cultures spontanées sans aucune épuration préalable. D'autres fois, il y a mélange de deux ou trois formes, que l'on retrouve dans les zones qui présentent les mêmes caractères. Finalement, un groupe de souches se précise, retenant l'attention, comme population bactérienne spécifique d'une terre donnée.

Il n'y aurait qu'à continuer la même expérience avec un

autre échantillon, pour voir si d'autres espèces y sont représentées. On s'assure bientôt que ce sont les mêmes types qui apparaissent dans tous les échantillons, quelle que soit leur origine. Ce n'est pas dire que toutes les terres produisent les mêmes taches que l'on voit sur la figure 14, planche V. Au contraire, un cas fréquent, surtout avec les terres de bonne culture, est l'envahissement exclusif du rond par des zones jaunes, ocre surtout. Évidemment, les vibrions qui les produisent y dominent. Mais on ne saurait en conclure que toutes les autres espèces y manquent, car l'envahissement précoce des fibres par ces vibrions pourrait prévenir ou masquer la formation de zones différentes. On trouve là l'explication du fait, paraissant paradoxal de prime abord, que les terres pauvres, non fumées et non cultivées, produisent des zones beaucoup plus variées que les terres fertiles. C'est le cas de notre parcelle dite *témoin*, laquelle, maintenue sans fumure et sans végétation pendant plusieurs années, est devenue si pauvre en microbes du groupe, que ses cultures spontanées restent « blanches » pendant cinq à six et même sept jours à 30°, quand toutes les autres sont déjà complètement envahies. Ce n'est qu'alors que quelques zones jaunes font leur apparition, suivies par les zones fibrolytiques (rose, orange, jaune d'œuf), ainsi que des zones vertes, bleu violet et noires. Ces dernières, dues à des mycéliums, viennent les dernières. Aussi, cette parcelle est pour nous la meilleure source des *Cytophagas*, dont la végétation est plus lente et surtout moins envahissante que celle des vibrions. Les rares germes qui s'y maintiennent viables peuvent donc repululer dans les cultures spontanées, sans être générés par les vibrions, à un état de pureté naturelle qui favorise énormément les débuts des expériences (voir photogr. mentionnées ci-dessus).

LA DIFFÉRENCIATION DES SOUCHES. — Rien de plus facile que de reproduire ces zones ou taches colorées avec tous leurs caractères sur des plaques neuves. Il est rare qu'on n'y réussisse pas par simple repiquage : on en choisit bien le point et on le touche avec le bout du fil de platine, ou encore mieux avec le bout d'une baguette de verre étirée en fil ; le plus léger attouchement suffit ; on passe ensuite le bout, en stries, sur le

rond à ensemencer. Il arrive souvent que deux zones différentes se reproduisent à la suite du même repiquage. Il s'agit alors de les séparer par la même manipulation, soit en les touchant à des points où elles paraissent le mieux différenciées.

Ce qui attire l'attention au cours de ces repiquages c'est une sorte de lutte, ou de résistance à l'invasion par des zones voisines. La figure 20 de la planche V sert à illustrer un cas de ce genre : l'on y voit une tache verte qu'une zone brunâtre a complètement encerclée sans jamais réussir à la couvrir. Sur la figure 21, on voit une tache rose se former à la suite du repiquage, mais là naît aussi une teinte jaune qui s'étend rapidement sur les parties libres du rond. Sur la figure 13, on voit la différenciation de deux teintes vertes. Enfin, les figures 17 et 22 — toutes peintes d'après nature — reproduisent la compétition des zones jaune et noire. Ces exemples suffiront pour donner une idée concrète de la manière de s'y prendre en procédant aux repiquages.

Quant à leurs résultats, trois cas se présentent. Dans le premier, le plus simple, déjà 3 à 4 repiquages successifs suffisent pour que les caractères de la lignée se fixent, touchant : 1^o au tableau microscopique; 2^o à la teinte communiquée au papier; 3^o aux modifications de sa contexture. L'action spécifique se maintenant constante et répondant toujours à la pullulation de la même forme, épurée jusqu'à l'uniformité complète, ou au moins, jusqu'à prédominance *décisive*, l'isolement de la souche peut être considéré comme suffisant.

Dans le second, la stabilisation des caractères est moins complète. Différenciées jusqu'à un certain degré, les cultures laissent remarquer encore quelque flottement dans leurs caractères secondaires, en quelque sorte : légères variations de taille, teinte légèrement variable, etc. Dans ce cas, il n'y aurait qu'à continuer les repiquages pour parfaire la séparation de souches évidemment très rapprochées, ce qui pourrait durer encore longtemps; à moins qu'on ne se décide à enregistrer la lignée comme *mélanges de souches parentes*.

Enfin, le troisième cas diffère des autres par le fait qu'on y constate la présence de *deux espèces* nettement différentes, mélange ou association, qui ne se laisse dissocier par aucun repiquage, aussi souvent répété que l'on a pu. Il s'agit sur-

tout de l'association — car tel paraît être le cas — de la *Cytophaga* avec un coccus caractéristique, dont il sera question dans la suite. Quelque subtil que soit le mode de repiquage, la reprise de la première est toujours suivie par la pullulation du coccus. De plus, il est intéressant à noter que la marche de cette double pullulation reste toujours la même et que son effet sur le papier présente un caractère particulier qu'on ne retrouve pas ailleurs. En attendant donc que l'on réussisse à dissocier ces agents pour mieux préciser le rôle de chacun, on étudiera l'effet combiné de leur association.

MÉTHODES DE COLORATION ET D'ÉTUDE MORPHOLOGIQUE. — Hutchinson et Clayton avaient déjà fait l'observation que le microbe découvert par eux se colore difficilement par les colorants conventionnels; que, de plus, son pouvoir de prendre la couleur varie beaucoup sous l'influence des conditions de culture, de sorte que souvent, même les méthodes de coloration les plus intensives ne donnent pas de résultats satisfaisants (*loc. cit.*, p. 151).

L'observation est parfaitement juste; elle peut être étendue à tout le groupe, que nous étudions. Les colorants basiques ordinaires sont complètement inutilisables; le Gram n'est pas pris; la coloration avec la fuchsine de Ziehl laisse beaucoup à désirer, elle aussi. Cette dernière méthode employée sans traitement différentiel, pour la rendre plus intensive, comme le veulent les auteurs anglais, donne des dépôts de colorants sur les fibres, ce qui gêne beaucoup l'examen microscopique. La netteté de la coloration n'en devient pas de beaucoup meilleure.

Une étude morphologique étant impossible sans une bonne méthode de coloration, on dut en chercher une qui fût applicable à tout le groupe avec un effet sûr. C'est celle qui est basée sur l'emploi de deux colorants, l'un acide, l'érythrosine, servant de mordant en quelque sorte, suivi de gentiane aqueux, que nous avons essayé. La méthode s'était déjà montrée antérieurement d'un puissant effet colorant, inégalé pour certains microbes par les méthodes favorites. Elle a encore le grand mérite de laisser les fibres presque incolores, ce qui permet d'observer la disposition des microbes qui les garnissent. Les

préparations restant très « propres », toute différenciation subséquente est inutile.

On procède ainsi : on arrache sur la plaque un flocon minuscule de papier qu'on désagrège au moyen d'aiguilles, aussi complètement que possible, dans une gouttelette d'eau sur une lamelle ; on étend les débris sur toute sa surface, on sèche, on fixe avec de l'alcool absolu, que l'on brûle en soufflant plusieurs fois dessus au moment même où il s'allume ; on couvre la lamelle avec une solution d'érythrosine extra à 1 p. 100, phéniquée à 5 p. 100. Au bout de quelques minutes, on lave en agitant la lamelle, tenue par une pince, dans un verre d'eau pendant quelques secondes ; on colore enfin avec une solution aqueuse peu concentrée de gentiane ; cinq à dix minutes suffisent.

Les cellules jeunes se colorent très intensément, la partie moyenne généralement beaucoup plus que les extrémités, laissant voir une sorte de grain chromatique situé juste au milieu de l'article : détail caractéristique pour la majorité de ces microbes.

Au fur et à mesure du vieillissement, la coloration devient de plus en plus faible, et l'on n'y remédie guère en prolongeant l'action des colorants. Enfin, vieillies, les cellules ne prennent qu'une teinte faible ; celles à l'état d'autolyse ne se colorent qu'à peine. Ces gradations, observées régulièrement et tant de fois, font conclure que la coloration au moyen de cette méthode et dans ce cas, donne la mesure, en quelque sorte, de la *vitalité* de la cellule ; rien qu'en observant sa teinte plus ou moins foncée on reconnaît si elle est jeune ou vieille, ou prête à s'éteindre, ce qui augmente la valeur de la méthode pour l'étude morphologique de ces microbes.

Toute observation sur les microbes vivants, en goutte pendante, étant trop malaisée dans ce cas, non seulement à cause de leur taille minuscule et de leur extrême délicatesse, mais surtout à cause de leur genre de nutrition aux dépens d'un corps solide, la seule manière de faire cette étude est de répéter l'examen microscopique des fibres revêtues par les microbes à différentes périodes de la culture, soit : 1^o au début même, aussitôt qu'apparaît la tache caractéristique, 2^o au bout d'une dizaine de jours, à un moment où la modifica-

tion s'est étendue sur le rond entier; enfin, 3° environ une quinzaine plus tard quand, le rond ne montrant plus aucun changement, il y a raison de conclure que la végétation est terminée.

Le premier examen révèle l'aspect le plus caractéristique des formes, libres encore de tout symptôme de dégénérescence, à laquelle elles inclinent tant; le second présente déjà quelque mélange de formes légèrement renflées, ou même accusant un commencement d'autolyse; au troisième examen, ces formes d'autolyse dominent, souvent jusqu'à ne laisser que peu d'individus ayant conservé la forme originale; au bout de quelque temps encore ces formes disparaissent parfois entièrement et la culture devient méconnaissable pour celui qui n'aurait pas suivi son histoire. C'est d'après ce programme qu'ont été exécutées les observations morphologiques rapportées dans la suite.

Plusieurs des formes vibroniennes possèdent une motilité très énergique facile à démontrer à l'ultra-microscope. La coloration des cils réussit pourtant difficilement; on n'y parvient pas au moyen des méthodes qui ont fait leur preuve. Plus satisfaisants sont les résultats obtenus en employant, selon la méthode de Muir, un mordant composé de 5 cent. cubes d'une solution saturée d'alun de potasse, de 2 cent. cubes de solution saturée de chlorure de mercure et d'autant de solution de tanin à 20 p. 100; on traite après lavage avec de l'érythrosine à 1 p. 100, phéniquée à 5 p. 100; on lave rapidement et on colore avec de la gentiane phéniquée. La coloration des cils est nette, mais on trouve en général assez rarement des individus munis de cils; est-ce à cause d'une motilité intermittente, ou à cause d'une délicatesse extrême de ces organes, c'est ce qui reste à préciser.

MÉTHODES CHIMIQUES. — « A mesure que nous pénétrons dans le domaine de la chimie de la cellulose, il nous apparaît de plus en plus inexploré, et la compréhension des réactions et de la nature des dérivés devient de moins en moins claire. Ceci est particulièrement juste en ce qui concerne l'oxydation de la cellulose et le produit principal de l'oxydation, désigné par Witz, qui l'a découvert, du nom d'oxycellulose. Il est bien douteux que

nous ayons affaire dans ce cas à un produit déterminé, toujours le même. C'est un fait que les produits innombrables que l'on a préparés au moyen de différentes méthodes d'oxydation diffèrent par leurs propriétés et par leur composition, quoiqu'il y ait aussi concordance sous certains rapports »... « Il est extrêmement difficile, par conséquent, de fixer les caractères de l'oxycellulose et de présenter un tableau irréprochable de sa nature possible, de sa constitution probable. »

C'est par cette tirade que débute le chapitre *Sur l'oxydation de la cellulose* du récent *Traité sur la chimie de la cellulose* de Emil Heuser (1).

En laissant la parole au savant chimiste — dont nous donnons la fidèle traduction — l'appréciation ne peut que gagner en autorité. La citer nous suffit pour donner une idée bien nette des incertitudes auxquelles se heurte le microbiologiste en abordant le sujet.

Il est cependant indispensable, pour se faire une idée de l'oxydation biologique — car il a été facile de se convaincre qu'il s'agit bien d'elle — de rappeler les principaux faits chimiques, consignés dans les traités faisant autorité en la matière (2), ainsi que les conceptions théoriques qui servent à les éclairer.

Si l'on considère la cellulose, d'après sa structure chimique, comme un alcool primaire polyvalent, il y a lieu de s'attendre à ce que le premier effet d'une action oxydante soit la transformation de l'un de ses groupes CH_2HO en groupe CHO , qui serait suivie, cet effet s'accentuant, par l'apparition de groupes carboxyliques formés soit aux dépens de l'un ou l'autre des groupes alcooliques, soit aux dépens de groupes aldéhydiques produits par la première oxydation. La molécule de la cellulose étant complexe, il en résultera des combinaisons variées présentant, d'un côté, les caractères d'*aldéhydes-alcools* comme les sucre ; d'un autre, les caractères des acides, déterminés par la présence des groupes CO. HO .

(1) Emil HEUSER, *Lehrbuch der Cellulose-Chemie*. Berlin, 1927. Citation, v. p. 118

(2) Carl SCHWALBE, *Die Chemie der Cellulose unter besonderer Berücksichtigung der Textil und Zellstoff-Industrie*, Berlin, 1911 ; G. ZEMPLÉN, *Die Kohlenhydrate. Abderhalden's Handbuch*, partie V, vol. I-III, 1922 ; H. PRINGSHEIM, *Die Polysaccharide*, Berlin, 1923 ; E. HEUSER, *Lehrbuch der Cellulose-Chemie*, Berlin, 1927.

Pour ce qui est des réactions aldéhydiques, le pouvoir réducteur apparaît déjà à la suite d'une hydrolyse modérée dans le cas de l'hydrocellulose de A. Girard; il s'accentue dans l'oxy-cellulose préparée au moyen d'oxydants énergiques, tels que hypochlorites, acide nitrique, permanganate, eau oxygénée, etc.; il croît généralement avec le degré d'oxydation.

L'existence de groupes carboxyliques a été également démontrée dans la molécule de l'oxycellulose par des méthodes chimiques irréprochables, et c'est à ce caractère d'acidité qu'est due la solubilité de l'oxycellulose dans les alcalis étendus. Elle s'y dissout en leur communiquant une teinte jaune d'or, réaction admise comme caractéristique pour les fibres oxydées. Ces dernières subissent de ce fait une perte de poids notable sous l'action des alcalis dilués, tandis que des fibres saines, dans les mêmes conditions, ne l'éprouvent point du tout, ou bien à un moindre degré.

C'est à ce même caractère d'acidité que l'on attribue la réaction si caractéristique des fibres oxydées envers les colorants basiques, tels que le bleu de méthylène ou la safranine, qu'ils retiennent, tandis qu'ils ne prennent pas les colorants acides. Un bain de bleu méthylène, employé de préférence, très étendu, ne dépassant pas 0,05 p. 100, où l'on laisse séjourner les fibres une vingtaine de minutes, que l'on soumet ensuite à un lavage de vingt-quatre heures dans de l'eau froide, donne un moyen facile de distinguer les fibres chargées d'oxycellulose des fibres saines : les premières retiennent une teinte très nourrie, tandis que les dernières se décolorent jusqu'à un azur très pâle. C'est le contraire avec un colorant acide, le poncneau de xylidine, par exemple : les fibres saines retiennent une teinte rose après lavage, tandis que les fibres oxydées restent complètement incolores.

Une dernière remarque est à ajouter concernant la marche du processus d'oxydation, observée invariablement dans de très nombreuses recherches, à savoir que la réaction mise en train par un oxydant quelconque, ne conduit jamais à un produit uniforme; elle ne marche que par étapes, en donnant un produit contenant une partie de la cellulose à l'état non encore attaqué, tandis qu'une autre partie s'y trouve parfois à un état de dégradation dépassant le produit que l'on visait à préparer.

Nous croyons pouvoir nous borner à ces données empruntées à la chimie de la cellulose, quelque incomplètes qu'elles soient, car elles nous suffisent déjà pour justifier les épreuves auxquelles nous soumettrons les fibres de nos cultures et qui seront : 1^o l'épreuve de la réduction dans la liqueur Fehling ; 2^o l'action des alcalis dilués ; 3^o le bain colorant.

Appliquée à la matière fibreuse, la première épreuve ne peut être que quantitative : on en détermine le « chiffre cuprique », soit le taux pour cent du cuivre dégagé par elle dans la liqueur Fehling bouillante. Sur ce point, on s'est heurté à une difficulté, car la seule méthode courante dont l'on dispose, celle de Schwalbe, est inappliquable dans notre cas, parce que trop compliquée et surtout exigeant beaucoup de matière. L'idée d'appliquer la méthode de Bertrand en l'adaptant à ce cas spécial a permis de tourner la difficulté.

Il n'y aurait qu'à prolonger l'ébullition en ajoutant plus d'eau et moins de réactifs ; à se servir pour la filtration d'un entonnoir à forme évasée, pouvant contenir quelques décigrammes de pulpe, sans que le filtre d'amianté en soit bouché ; à prendre enfin, pour le titrage, une solution de permanganate plus faible que pour les dosages des sucres. En prenant 10 + 10 des réactifs A et B, en ajoutant 50 cent. cubes d'eau, en faisant bouillir cinq minutes, en titrant avec une solution de permanganate à 3 p. 1.000, la méthode s'est montrée assez pratique et sensible. Bien entendu, on éprouve soigneusement les réactifs à blanc, car il s'agit de quantités très faibles. En se servant de cette méthode, on a dosé le pouvoir réducteur des matières fibreuses qu'on soumettait à l'oxydation biologique et on a trouvé :

CHIFFRE CUPRIQUE

Hydrocellulose (diverses préparations)	3,4 à 5,0
Coton hydrophile	0,4 à 0,5
Filtre Durieux « Super »	0,8
Filtre Durieux, n° 111 (traité par les acides)	1,0 à 1,6
Cotonnade, genre percale.	Néant.

On voit que la marque de papier utilisée pour les plaques contient déjà des quantités dosables, ainsi qu'un peu variables d'oxycellulose ; le pouvoir réducteur ne peut donc être déterminé que par la différence entre sa valeur originale et sa

valeur finale, ce qui rend la tâche délicate, surtout dans le cas d'un pouvoir faible.

La méthode des *chiffons* permet d'éviter la difficulté et présente d'autres avantages pour l'étude chimique, déjà notés. Ajoutons-en encore un, non encore mentionné : à savoir que les chiffons se prêtent facilement à l'extraction du produit d'oxydation, ce qui donne le moyen d'établir des rapports quantitatifs entre la cellulose pure qui reste et ce produit, ainsi que d'étudier séparément les propriétés de ce dernier.

Reste à décrire le procédé adopté pour l'analyse des cultures sur plaques de silico-gel, ayant renoncé dans ce cas, comme on se le rappelle, au milieu liquide universellement employé jusqu'à ce jour, quand il s'agit d'établir le métabolisme des espèces microbiennes. L'usage du gel minéral comme véhicule des aliments n'y introduit aucune complication sérieuse.

Dans le cas d'espèces non fibrolytiques cultivées sur papier, qui laissent toujours un reliquat plus ou moins important de fibres apparemment peu modifiées, on commence, bien entendu, à en déterminer la quantité. Selon l'espèce, le reste de papier se laisse enlever plus ou moins facilement. Parfois on y réussit le plus aisément, en versant sur la surface de l'eau par petites portions et en imprimant à la soucoupe un léger mouvement de balancement : le rond se transforme en pulpe qui surnage et qui forme de gros flocons que l'on jette sans perte dans un verre. Par des lavages successifs, la surface du gel est alors proprement débarrassée de tout reste de pulpe. Si le rond ne se détache pas spontanément, on parvient tout de même à enlever le gros des fibres, en frottant, sous l'eau, le rond de papier au moyen d'une spatule en porcelaine ; en séchant ensuite le silico-gel, on le transforme en menu gravier tenant le reste non dégagé ; jeté dans un bocal rempli d'eau, et agité énergiquement au moyen d'une baguette, ce gravier est débarrassé à son tour des fibres qui y adhèrent, à condition de continuer le rinçage jusqu'à ce que l'eau ne laisse plus voir, ni fibres suspendues, ni sédiment floconneux déposé sur le gravier.

La manipulation se simplifie beaucoup si on se sert de chiffons, qu'on enlève de la surface au moyen d'une pincette à bouts pointus.

La plaque est finalement séparée en trois ou quatre portions : 1^o les fibres qu'on soumet aux épreuves déjà mentionnées ; 2^o leur extrait aqueux, où on détermine le pH, l'azote, les produits volatils, etc. ; 3^o le gel silicique séché, pesé, puis réduit en poudre impalpable, qui sert telle quelle, ou sous forme d'extrait aqueux, aux mêmes déterminations.

CARACTÉRISTIQUES DES ESPÈCES BACTÉRIENNES.

Nous avons eu l'occasion de différencier et d'étudier d'une manière plus ou moins complète jusqu'à une douzaine de souches appartenant à des formes différentes. Acquérir une vue d'ensemble sur cette tribu de bactéries assez bigarrées sous le rapport de leur morphologie, mais rapprochées par leur fonction commune, nous a paru préférable, comme début de recherches, à une étude détaillée de quelque espèce unique imposée par quelque hasard à l'attention. Mais, pour intensifier le travail, on a été forcé de se borner pour le moment aux plus intéressantes et on a choisi, pour représenter les groupes, quelques formes typiques qui ont été soumises à une étude plus suivie. Le reste des souches n'a pu être caractérisé que d'une manière assez sommaire, mais suffisante pour justifier leur fonction d'agents de dégradation de la cellulose.

On tentera un essai de classification en résumant les résultats acquis.

Quant à la nomenclature, le nom *Cytophaga* paraît bien expressif ; pour les autres, on pourrait garder les anciens noms se rapportant à la forme, mais en ajoutant l'abréviation *Cell* ; on dirait ainsi *Cellvibrio*, au lieu de *Vibrio*, en précisant par ce nom générique la forme et la fonction. Pour désigner l'espèce, on profiterait du caractère macroscopique le plus manifeste, par exemple la teinte du papier attaqué sur le milieu-type, pour dire, par exemple : *Cellvibrio ochracea*. De même avec les autres formes.

LES CYTOPHAGA. — Quant on aperçoit sur la culture spontanée des zones vivement colorées en jaune-d'œuf, ou en rose orange, ou en rouge-brique qui rendent le papier diaphane, presque dès leur apparition le diagnostic de *Cytophaga* se confirme bien souvent. On s'en assure facilement au premier

examen microscopique, et en les repiquant, on a au bout de trois-quatre jours des cultures très caractéristiques et paraissant même parfois pures au premier abord; tout cela à condition de suivre la technique que nous avons décrite en détails et sur laquelle nous ne reviendrons plus. D'autres fois, les pullulations apparaissent hétérogènes, contenant, avec les *Cytophaga*, un fort mélange de coccus. Ce mélange étant difficile à dissocier, il est préférable dans ce cas de revenir aux cultures spontanées et de chercher des zones moins mélangées.

L'aspect de leurs pullulations est bien particulier et facilement reconnaissable du premier coup d'œil. L'examen des quatre photographes de la pl. VI et les n°s 4-5, de la pl. VII, suffit pour s'en assurer. On y voit les tableaux microscopiques que nous ont présentés quatre souches sur un total de cinq que nous avons eu l'occasion d'isoler de différents échantillons de terre. Deux seulement, la grande forme que l'on voit sur la pl. VI, n°s 2-4 et la petite de la pl. VI n° 1 et de la pl. VII n° 1 ont pu être maintenues en culture pendant une période suffisamment longue pour les étudier de plus près. La dernière des deux, qui paraît la plus répandue dans toutes les terres, est identique à la forme découverte par Hutchinson et Clayton dans la terre de Rosthamsted et décrite sous le nom de *Spirochæta cytophaga*, que nous proposerons de remplacer par le nom de *Cytophaga Hutchinsoni*.

Nous devons aux auteurs anglais de commencer par l'analyse de la caractéristique qu'ils en donnent.

CYTOPHAGA HUTCHINSONI. — *Morphologie et Culture.* — La forme dominante dans les jeunes cultures est celle de filaments sinuieux très ténus, un peu plus épais au milieu, où ils n'atteignent que 0,3-0,4 μ , retrécis aux deux bouts. Dans certaines conditions, on trouve des formes en U et en S, ainsi que des formes spiralées ou spirochétiques, et c'est ce fait et la flexibilité apparente des filaments qui justifiaient le nom choisi pour désigner l'espèce.

Remarquons tout de suite, pour justifier de notre coté le changement de nom que nous avons proposé, que ces formes spirochétiques sont rares, même exceptionnelles, ce que nous apprend déjà l'examen des nombreux photographes des auteurs

eux-mêmes. Le caractère le plus saillant des vrais spirochètes, qui leur donne leur physionomie propre et dont dépend probablement le mécanisme de leurs mouvements fait donc ici défaut, ou apparaît rarement. A cette divergence s'ajoute : la motilité douteuse, ou en tout cas bien différente de celle des spirochètes, la forme acuminée, leur lieu d'habitation, enfin, leurs fonctions bio-chimiques si strictement spécifiques ; tous ces caractères en font un groupe bien à part, qu'il serait rationnel de ne pas incorporer à un grand groupement vaguement caractérisé, en se guidant par une ressemblance de forme assez incertaine.

En revenant aux données morphologiques consignées dans le mémoire, nous trouvons les auteurs aux prises avec la difficulté insurmontable d'isoler le microbe à l'état de pureté complète. Malgré tous leurs efforts, leurs cultures sur plaque gélose-papier contenaient toujours deux formes bien distinctes, dont l'une était le soi-disant spirochète, l'autre un grand coccus. L'impossibilité de les séparer et de décider « laquelle des deux serait responsable de la décomposition du papier », les fit même abandonner leurs efforts pour un temps. A la reprise, ils ont fondé toutes leurs espérances de réussite sur l'application aussi large et systématique que possible de la méthode de dilution. Les ensemencements se faisaient cette fois dans des tubes à essai chargés de solution minérale avec du papier, et c'est dans l'un des tubes ayant reçu une semence diluée à 1×10^7 qu'ils constatèrent la présence de petits filaments, seuls, sans coccus. Immédiatement, cette culture paraissant pure fut employée pour ensemencer à divers degrés de dilution une nouvelle série de tubes. Le résultat en fut décevant : toutes les cultures sans exception apparurent de nouveau peuplées par les deux mêmes formes différentes, filaments et coccus réunis.

Cette fois les auteurs, confiant dans leur méthode, se crurent autorisés à admettre que ces deux formes appartiennent à une seule et même espèce, qui pullulerait à l'état jeune sous forme de filaments, lesquels s'arrondiraient en vieillissant en coccus. Doit-on considérer ces derniers comme spores ou, en général, comme forme de repos et reproduction ? Les auteurs sont indécis sur ce point, mais pour éviter la désignation de *coccus* ou de *coccoïde*, qui éveille l'idée d'une forme autonome, et

puisque la culture aboutit toujours à ces formes arrondies, censées reproduire à nouveau les filaments, ils avancent le terme *sporoïdes*, pour indiquer leur fonction reproductrice présumée. Entre ces deux états, il y aurait encore des stades intermédiaires, se présentant sous forme de corpuscules renflés, ovoïdes ou même pyriformes, se colorant à peine et à contours si pâles qu'on les prendrait presque pour des « ombres » (*a little more than a shadow. Loc. cit. p. 153*). En effet, on trouve ces caractères bien reproduits particulièrement sur leurs photogr. 1 et 2 de la pl. II, ainsi que sur d'autres. Cet état « d'ombres » ne serait pourtant que transitoire, car ces sporoïdes regagneraient bientôt une colorabilité normale, ainsi que l'aspect de coccus typiques et même, ajouterons-nous, jusqu'à la disposition en chaînettes à la façon des streptocoques (*l. c. pl. III, n° 4*).

Empressons-nous de dire que ce cycle, impossible à démontrer par des observations directes, à cause de la nature même du sujet, n'a été admis par les auteurs qu'en qualité d'hypothèse plausible, sujette à révision à la lumière d'observations ultérieures. Mais depuis, plusieurs observateurs ont eu en main des cultures semblables, avec la même succession de formes, soit : pullulation de petits filaments au début, apparition des « ombres » arrondies, augmentation croissante des coccus, jusqu'à ce qu'on les trouve finalement à l'état de pureté quasi complète et sans aucune trace de la forme grêle du début; enfin, à la reprise, réapparition de cette dernière et ainsi de suite. Toutes les apparences parlaient en faveur du cycle décrit et il a été, paraît-il, universellement accepté sans soulever d'objection.

Et cependant, ces apparences sont singulièrement trompeuses dans ce cas. Les faits étant parfaitement exacts, ce n'est que leur interprétation qui pèche. La première cause en est la confiance dans la méthode de dilution, bien injustifiée dans le cas présent. En effet, cette méthode assez incertaine, en somme, ne promet le succès que quand il s'agit de germes se nourrissant d'aliments solubles et bien dispersibles dans le liquide. Or, les *Cytophaga* vivent, comme on le verra, sur les fibres mêmes en s'y incrustant; certes, des individus s'en détachent par l'agitation, mais la dilution contient en même temps beaucoup de débris de fibres couverts par des milliers d'individus, tant *Cyto-*

phaga que commensaux. Il y a donc autant de chances d'ensemencement à de hautes dilutions par un seul individu, que par un groupe nombreux introduisant dans la nouvelle culture le peuplement de la vieille, intégralement. Il est, de plus, impossible de se faire une idée du peuplement de la culture-mère, quand il s'agit de papier immergé dans un liquide ; homogène sur un point, il peut loger des nids de microbes étrangers sur d'autres. Il y a donc toute raison de se défier des résultats de la méthode de dilution, et puisque la seule méthode sûre d'isolement, celle des plaques de gélatine et de gélose, n'est pas applicable dans le cas présent, il est indispensable, avant de construire des cycles de développement, de rechercher au moins *si le même assemblage de formes se retrouve régulièrement dans toutes les cultures de la forme intéressante*. Pour cela, sans s'obstiner à opérer avec la souche ou le mélange dont on dispose, on isole, autant que faire se peut, à nouveau le microbe de plusieurs échantillons de terre différentes. Si le cycle de forme se répète, il y aurait présomption en faveur de relations génétiques, sinon, la conclusion contraire deviendrait probable : celle d'une association ou d'un mélange difficile à dissocier. C'est là une méthode qui est à recommander expressément dans des cas semblables, et son application devient aisée et rapide en se servant des cultures spontanées décrites dans le chapitre consacré à la technique.

Or, dans le cas en question, ces soit-disant sporoïdes sont loin d'être constamment présents dans les cultures des *Cytophaga* ; au contraire, on trouve cette combinaison plutôt rarement. On en trouve d'autres, par exemple celle que l'on voit sur notre planche VII, n° 2, soit des coccus nettement différents, qui remplacent la forme streptococcique, reproduite sur la figure 2, planche III, du mémoire anglais et sur notre figure 7, planche VII, dont l'identité ne fait aucun doute. Le plus souvent, les cultures en sont libres, contenant quelques formes en bâtonnet, qui y tiennent un rôle plus effacé, et qui n'éveillent pas l'idée d'un rapport génétique avec la forme dominante. Les sporoïdes, eux aussi, ne sont que des coccus étrangers qui pullulent dans le milieu avec une grande abondance, en suivant les pullulations des *Cytophaga* et surtout vers le déclin de celles-ci.

Quant aux formes supposées transitoires entre les deux, ces corpuscules arrondis, pâles, incolores, ce ne sont guère que des *formes d'autolyse* à laquelle le microbe est sujet à un degré peu banal. Les observations auxquelles nous passons viendront appuyer cette conclusion.

Il faut donc conclure que les auteurs des premières recherches sur la *Cytophaga*, qu'ils jugeaient impossibles de poursuivre sans avoir isolé le microbe en culture pure, ont tout de même échoué dans cette tâche après de longs et pénibles efforts. Malgré les réserves qu'ils font concernant la marche du développement, le fait persiste donc que leurs observations ont été recueillies sur un mélange de deux espèces et non sur une culture pure comme ils le croyaient.

En prenant ce travail pour point départ, on est donc acculé dès l'abord à une double question, à savoir : est-il possible d'isoler le microbe à l'état de pureté absolue et par quel moyen ? Si cela ne réussit pas, pourrait-on y renoncer, en arrivant tout de même à des résultats morphologiques et physiologiques solidement établis ? Il y a là un point méthodologique d'une portée générale, que l'occasion commanderait de discuter ici même, ce que nous ferons aussi succinctement que possible.

La méthode des plaques, la seule sûre, est inapplicable dans ce cas, car on ne trouve pas de milieu solide, où ces germes, emprisonnés dans le milieu ou au moins fixés sur sa surface, pourraient fournir des colonies séparées, visibles à l'œil nu. La feuille de papier étendue sur le gel, même dépourvue de tout excès d'humidité, ne peut remplacer un milieu de ce genre pour des raisons faciles à comprendre ; de l'étendre sur gélose au lieu de silicogel, cela ne changerait rien. Disperser les germes dans la gélose et la couvrir de papier stérilisé après solidification paraît mieux, mais dans ce cas les taches colorées, soit les colonies sur papier, n'apparaissent qu'à la suite de très forts ensemencements ; quant à des semences plus étendues, les seules qui ont des chances de fournir des colonies pures, elles ne donnent plus de culture, la grande majorité des germes emprisonnés dans la gélose ne pouvant, évidemment, atteindre les fibres, seule condition de leur pullulation. Dans toutes les tentatives faites au moyen de cette dernière

méthode, l'examen microscopique des taches ou colonies n'a révélé, en effet, que le mélange originale.

Sans doute, en persévérant et en multipliant à l'infini les tentatives, on pourrait peut-être arriver par quelque heureux hasard à un résultat décisif, mais le travail serait trop long et fastidieux avec des chances trop incertaines; autant dire qu'il est presque prohibitif.

Ce n'est pas encore tout. L'examen microscopique le plus soigneux est impuissant, comme on le sait depuis longtemps, à découvrir les germes étrangers latents, s'ils sont présents en petit nombre. Ce serait donc une illusion que d'affirmer la pureté *absolue* des cultures, en ne s'appuyant que sur l'homogénéité de leur peuplement microbien. Une *épreuve de culture spéciale* serait alors nécessaire, dont l'épreuve de culture sur bouillon, pour démontrer la pureté des cultures des *Nitromonades* et *Nitrobacters* est un exemple des plus anciens et des plus connus. Avant donc d'affirmer avoir satisfait au principe classique de la culture pure, il serait indispensable d'imaginer et de mettre en œuvre une épreuve de ce genre, ce que l'on n'oublie que trop souvent; une telle épreuve serait parfois bien malaisée à trouver.

D'autre part, les recherches sur les microbes du sol ont fait voir que la pureté absolue des cultures n'est pas nécessaire pour l'étude de certains microbes à fonctions spécifiques; indispensable par rapport aux microbes protéolytiques et glycolytiques, elle ne l'est pas dans ces cas, où la concurrence est moindre par le fait même des conditions spéciales au processus, qui en éloignent les espèces banales. En se tenant dans ce cas à un milieu électif convenablement choisi et à condition de ne pas s'en écarter, les recherches ne sont que peu gênées par la présence de la mauvaise herbe bactérienne, et on trouve le moyen de distinguer son action, s'il y a lieu, de celle de l'espèce dominante.

Voudrait-on exiger dans ce cas également une épuration complète comme condition *sine qua non* des recherches microbiologiques? Il n'en résulterait qu'un arrêt ou une entrave à leur progrès, comme cela a été le cas pour la question qui nous intéresse. Aussi, nous sommes-nous refusé à prendre le principe de la culture pure, dans le vrai sens du mot, comme

base immuable du travail, et nous espérons démontrer dans la suite qu'en épurant les cultures jusqu'à ce qu'elles présentent des caractères morphologiques et physiologiques stables, on arrive à des résultats suffisamment clairs. Le travail devient, il est vrai, plus difficile, exigeant surtout un contrôle microscopique renforcé, mais en revanche les observations deviennent plus instructives, nous révélant mieux les rapports naturels des espèces.

En revenant au groupe des *Cytophaga*, le degré voulu a été atteint au moyen de simples repiquages souvent répétés, en partant d'une zone assez pure, particulièrement ne contenant pas de forme *Coccus*. Nous en avons seulement affiné, autant que possible, la manipulation ; on ne faisait que toucher aussi légèrement et rapidement que possible avec le bout d'un fil de verre capillaire un point choisi et soumis à l'examen microscopique, puis de la même manière le rond neuf. Un point coloré en naissait, dont on tirait des stries sur ce rond. Examinées d'après la méthode décrite, les pullulations se présentaient parfaitement homogènes et caractéristiques, comme il est facile de s'en assurer en examinant les photogrammes de nos trois planches VI à VIII, qui témoignent de la pureté microscopique des cultures. Elles ne l'étaient pas au sens strict du mot, car cette pureté ne durait, dès le début de l'attaque du polysaccharide insoluble, que jusqu'à son plein développement, quand le milieu se chargeait de produits solubles ou dispersibles de cette attaque ; on remarquait alors des pullulations de germes étrangers jusqu'alors invisibles ; d'abord légères, puis de plus en plus notables vers la fin de la culture, elles atteignaient leur maximum avec l'autolyse générale de la forme dominante. C'est au moyen de cultures de ce genre, très nombreuses, que les résultats que l'on trouvera décrits dans les pages qui suivent ont été recueillis. Ils sont d'accord dans l'essentiel avec ceux de Hutchinson et Clayton, ce qui fait penser que ces auteurs ont pu saisir les caractères de la forme dominante, malgré la présence d'une seconde forme associée et non reconnue telle.

Passons à la description détaillée de nos expériences de culture. Rien de plus caractéristique que ces cultures sur les plaques silico-gel-papier selon la technique indiquée. Après repi-

quage en stries d'une culture jeune, des points muqueux d'un jaune très brillant, nuance jaune d'œuf, apparaissent au bout de deux jours. En tenant la plaque à contre-lumière, on s'aperçoit que le papier sous ces points devient aussitôt diaphane. Le mucus jaune s'étend les jours suivants en formant des



FIG. 1. — Culture de *Cytophaga Hutchinsoni*
sur quatre secteurs papier ensemencés successivement: Grandeur naturelle.

stries bombées qui s'élargissent de plus en plus jusqu'à ce que la feuille de papier se soit transformée entièrement en couche de gelée homogène et intensément jaune. La figure 24 de la planche en couleur montre ces stries peintes d'après nature, et le photogramme ci-contre reproduit la marche d'une plaque portant quatre secteurs ensemencés successivement; on y distingue facilement le plus récent (ensemencé en stries

depuis cinq ou six jours), les deux intermédiaires, enfin le plus âgé, d'environ douze à quatorze jours, où il n'y a qu'une couche de gelée transparente de plus d'un millimètre d'épaisseur.

Quelle que soit l'étendue de la feuille, elle subit le même sort pendant à peu près le même délai, à condition d'être ensemençée sur plusieurs points, cela avec une semence aussi minime que possible, car elle n'a lieu qu'au moyen d'un attouchement par l'extrémité d'un fil de platine ou de verre. Nombreuses ont été les grandes plaques de 20 centimètres de diamètre où l'on a vu un rond de 150 millimètres entièrement transformé en une couche de gelée reproduisant exactement les contours de la feuille de papier disparu. L'aspect en est peu banal.

Cette gelée perd bientôt sa coloration jaune ; transparente, presque incolore, elle rappelle alors une couche de gélatine. Tenue dans une chambre humide, elle se maintient pendant de longs mois dans le même état, quelles que soient les impuretés de la semence originelle et sans qu'on prenne des précautions pour la préserver d'une infection par des spores de moisissures ou autres. La grande majorité des microbes ne peuvent évidemment pulluler aux dépens de cette matière, qui ne disparaît que sous l'action de microbes spéciaux, dont il sera question dans l'une des publications à venir.

Quant à la forme du microbe, nous n'avons plus à la décrire, sa description parfaitement exacte étant déjà faite par les microbiologistes anglais. Mais on ne trouve encore aucune observation touchant à son mode de végétation particulièrement intéressant, notamment sa manière d'attaquer les fibres. Nous avons déjà eu l'occasion de dire que la végétation du microbe se concentre sur les fibres, exclusivement, paraît-il. Ce qui attire l'attention déjà dans des préparations faites avec un flocon arraché d'une tache jaune à peine naissante, c'est la densité et la régularité de la disposition de ces filaments sur les parois des fibres attaquées : ils y forment un revêtement régulier composé d'individus logés parallèlement et orientés dans la même direction. On y observe souvent des tableaux frappants qui paraissent démontrer qu'ils s'y fixent en s'adaptant en quelque sorte à la structure de la membrane qu'ils garnissent. Ainsi, s'ils habillent une fibre, dont les parois ont une struc-

ture spiralée, on les voit dirigés dans la direction de la spirale, par exemple, de gauche à droite sur la paroi supérieure de la fibre couchée devant l'observateur, mais de droite à gauche, en suivant toujours le tour de la spirale, du côté opposé. On trouve certainement dans les préparations beaucoup d'individus éparpillés qui se sont détachés du revêtement à la suite du travail des aiguilles de préparation ; mais la majorité reste en amas caractéristiques, éveillant l'idée de lambeau de revêtement. Les photographies de la pl. VI, n°s 1, 2, 4, et de la pl. VII, n°s 1 et 3, sont instructifs comme tableaux de ce revêtement, encore qu'ils ne reproduisent pas ses aspects les plus réguliers assez difficiles à trouver et à illustrer à cause du dérangement causé par la préparation.

Ce mode d'attaque, si caractéristique et toujours le même, est significatif, car il démontre que le microbe n'agit pas sur la matière à distance au moyen de la sécrétion d'une enzyme fibrolytique, mais seulement en contact immédiat, qui éveille probablement la fonction de quelques organes spéciaux.

Motilité. — Une question ouverte est celle de la motilité de ces organismes. Nos prédecesseurs ont cru observer en goutte pendante quelques mouvements rotatoires, ainsi que quelques déplacements dans le liquide, sans que la motilité soit générale ou, paraît-il, assez bien marquée ; il ne leur a pas été possible de démontrer la présence de flagelles. De notre côté, nous n'avons pas observé de mouvements dans le liquide, pas même en étudiant des suspensions à l'ultra-microscope. Il paraît tout de même impossible de leur dénier tout pouvoir de locomotion seulement en envisageant la régularité si singulière des revêtements des fibres qu'ils doivent atteindre et s'y ranger avec ordre, ce qui serait irréalisable pour des êtres complètement dépourvus de locomotion. Et puisqu'il s'agit d'un déplacement sur un corps solide c'est un mouvement rampant qui apparaît comme le plus probable. Nous avons cherché des organes adaptés à ce genre de locomotion et nous avons cru les observer, non sur l'espèce grêle dont nous parlons, mais sur l'autre, plus forte, sous forme de *haustoires* minuscules émergeant des contours de l'individu. Mais ce détail atteignait la limite de la visibilité, et la méthode, celle de la coloration des cils, paraissait peu appropriée au but. De longs tâton-

nements seraient encore nécessaires pour en élaborer une, de sorte que nous sommes encore loin d'insister sur la réalité de cette observation.

Autolyse. — Quoique encore insuffisamment étudié, le phénomène d'autolyse n'est pas rare, comme on le sait, chez les bactéries ; mais il est à croire qu'il ne se trouve pas d'espèces chez lesquelles ce phénomène soit aussi régulier et aussi général que chez les *Cytophaga*. Il est l'aboutissement ordinaire de toute culture, quelque luxuriante qu'elle soit. Les filaments vermiculaires se gonflent, en passant graduellement à l'état de corpuscules sphéroïdaux, peu réfringents, sans contours précis et ne prenant plus la coloration. Généralement, en suivant la marche de la culture, on constate que les pullulations normales ne durent qu'autant que les filaments sont logés sur des fibres non encore désorganisées. Il est possible qu'ils s'y tiennent jusqu'à un état avancé de désorganisation, car il n'est pas rare que l'on trouve des sortes de pseudomorphoses ou de gaines microbiennes gardant la forme de la fibre, mais déjà vides de celle-ci (voir pl. VI, n° 3). Mais les premières formes autolysées apparaissent, isolées, bien avant la disparition des fibres, et leur quantité croît rapidement jusqu'à la disparition *totale* de la forme filamentuse. Il est facile, en examinant la culture, de trouver tous les états de transition entre la forme végétative et son produit d'autolyse. Le premier signe de la transformation est le refus de prendre la couleur, soit la disparition graduelle de la matière chromatique ; puis le gonflement, qui atteint le filament tantôt sur toute la longueur, tantôt à l'une de ses extrémités ; des corpuscules allongés, ou piroiformes, ou en têtard en résultent. On trouvera toutes ces formes de transition sur les photogrammes pl. VII, n°s 6 et 8, représentant des cultures à cet état. Au début du processus, les corpuscules conservent encore quelque colorabilité ou contiennent quelques granules chromatiques qui disparaissent à un état plus avancé ; les petites sphères sont alors dénuées de tout détail de structure, absolument homogènes, à peine colorables et sans contours précis. On les voit rester en cet état pendant des semaines en train de s'évanouir complètement.

Le rôle que leur attribuaient Hutchinson et Clayton a dirigé naturellement l'attention sur la question de savoir si ces

« sporoïdes » sont capables de reproduire la forme végétative. Malgré des essais bien assidus, nous n'avons jamais pu nous en assurer. En utilisant la gelée des cultures finies, qui est pleine de ces corpuscules, pour ensemencer une plaque neuve, la reprise ne se fait généralement que dans le cas où la plaque-mère n'est pas trop ancienne, mais toujours très tardivement, au bout de huit jours par exemple, au lieu des deux jours habituels au repiquage. En prenant une plaque vieille de plusieurs semaines, où l'on distingue pourtant encore les mêmes corpuscules par milliers, aucune reprise n'a plus lieu. On est allé jusqu'à étendre des grumeaux gros comme un pois sur la plaque neuve; en la tenant à 30° on l'examinait journellement en arrachant des flocons de papier sur les points précis où la gelée était déposée et où on pouvait retrouver facilement des corpuscules pâles qu'on y avait mis: on n'a jamais réussi à constater des états de germination indubitables et le plus souvent la nouvelle plaque ne donnait plus aucun signe de vie.

Ce fait explique un désagrément fréquent dans ces études: nous entendons la perte de quelque souche maintenue en culture et à laquelle on tient. C'est que ces microbes ne prospèrent qu'aussi longtemps que l'on s'applique à repiquer les plaques à des intervalles assez rapprochés, toutes les trois semaines, par exemple; si on les laisse, par contre, à l'état entièrement fibrolysé et autolysé plus longtemps sans requipage, la lignée s'éteint facilement, et on est obligé d'en chercher de nouveau l'équivalent dans le sol. Ceci fait penser que les pullulations du microbe, même les plus riches, n'aboutissent pas, du moins régulièrement, à la production de formes de repos ou de conservation tant soit peu résistantes. Cette propriété négative, qui rend leurs pullulations fragiles, est probablement la cause de la rareté relative de leurs germes dans un sol non enrichi de cellulose.

Reproduction. — Un manque total de stades de repos ou de reproduction est tout de même difficile à admettre; il est contredit par le fait que nous avons observé sur notre terre *témoin*, à savoir que cette terre, maintenue pendant des années libre de toute végétation, donc dépourvue de cellulose, contient toujours des germes de *Cytophaga*, assez rares il est vrai, mais bien viables. Il serait donc plus probable d'admettre que

ces stades ne font pas défaut, mais qu'ils ne se produisent que dans les conditions spéciales, qui ne sont pas réalisées dans les cultures. On a mis beaucoup de soin à rechercher si ces organismes possèdent une sporulation. Dans cet ordre d'idées l'attention est attirée par un détail caractéristique de leur structure, notamment la condensation du protoplasme dans la partie moyenne du filament, détail déjà signalé par Hutchinson et Clayton : le phénomène rappelle trop vivement les stades précédant la sporulation endogène chez les bacilles, pour ne pas y penser. Malheureusement, ce n'est que tout récemment que l'on a pu faire une observation qui a paru encourageante dans ce sens ; mais puisqu'elle est restée encore incomplète, nous préférions ne pas insister. Ajoutons que l'on observe toujours dans les vieilles cultures, entre les masses autolysées, des granules d'environ un demi-micron de diamètre qui pourraient bien être, sinon des spores endogènes, du moins des produits de fragmentation des filaments, des sortes d'arthrospores.

Caractères physiologiques. — Les données physiologiques apportées par le travail de Hutchinson et Clayton sont particulièrement intéressantes, et ce serait le moment de les résumer. Le fait qu'elles se rapportent non à une espèce isolée, mais à une association de deux espèces, n'en diminue en rien l'intérêt, ni bien entendu, la réalité.

Très nombreuses et soignées ont été leurs expériences ayant pour but de cultiver le microbe aux dépens de différents aliments dans un milieu dépourvu de cellulose. Ils n'y ont jamais réussi. Comme source d'azote, le microbe est capable d'utiliser la peptone, mais à condition que la concentration ne dépasse pas 0,25 p. 100 ; les concentrations supérieures paralysent tout développement. En fait d'aliments hydrocarbonés, des alcools supérieurs, des sucres, des polysaccharides, tels que mannite, dulcite, adonite, arabinose, dextrose, lévulose, galactose, saccharose, maltose, lactose, raffinose, amidon, dextrine, inuline, puis un nombre d'acides organiques sous forme de leurs sels de chaux, ont été essayés avec un résultat complètement négatif. Le microbe ne donnait pas de culture à leurs dépens. Mieux que cela : de faibles doses de ces substances suffisaient pour inhiber ou suspendre les pullulations, même

en présence de la cellulose. Elles agissaient donc comme des antiseptiques, et cet effet était plus prononcé dans le cas des sucres réducteurs (dextrose, lévulose, galactose etc.) qu'avec les sucres non réducteurs. Le dextrose, par exemple, n'était toléré qu'à la dose de 0,05 p. 100 au maximum, le maltose de 0,018 p. 100, tandis qu'avec le saccharose on pouvait éléver le taux jusqu'à 1,25 p. 100, sans paralyser la décomposition du papier.

En comparant cette intolérance de la *Cytophaga* envers les meilleurs aliments organiques avec celle des microbes nitrificateurs, d'après les anciennes données de Winogradsky et Oméliansky, les auteurs anglais constatent que leur microbe est plus sensible que ces derniers. Fait frappant, si l'on songe que les nitrificateurs, qui sont capables de chimiosynthèse, n'ont nul besoin de substances organiques, énergétiques et plastiques, tandis que les *Cytophaga* en font, au contraire, une grande consommation, qui ne s'exerce pourtant que sur le polysaccharide chimiquement le plus résistant, sans pouvoir tolérer les saccharides solubles et généralement les mieux assimilables pour l'énorme majorité des êtres vivants. Si l'on songe que la cellulose dégradée par l'hydrolyse ne donne que du glucose, l'intolérance envers cette dernière apparaît encore plus énigmatique.

Nous n'avons rien à ajouter à ces données, si ce n'est qu'elles sont d'accord avec nos propres observations. On n'est pas allé jusqu'à refaire ces expériences sous la même forme, mais la même conclusion s'est imposée, très précise : celle de l'activité toute spécifique du microbe, de son incapacité de pulluler aux dépens d'une substance autre que la cellulose et seulement en contact immédiat avec elle. On n'a jamais remarqué la moindre trace de pullulation dans les milieux gélosés à peptone, à glucose, à amidon, à gomme (voir p. 564). Elle progresse bien sur la gélose pourvue d'azote et de sel minéraux, mais à condition d'y étendre une feuille de papier. Ce milieu est moins favorable que notre milieu standard, déjà par le fait qu'il ne résiste pas si bien à l'invasion des moisissures.

On n'a même pas réussi à avoir des cultures sur les plaques gélosées contenant de l'hydrocellulose (voir p. 563). À la suite d'essais réitérés, on n'a observé que sur une seule plaque une seule colonie jaune qui a mis plus d'un mois à se former et qui

contenait une faible pullulation de *Cytophaga* accompagnée du vigoureux développement d'un coccus. Il est probable que c'est la gélose qui fait dans ce cas obstacle à sa multiplication.

Action sur la cellulose. — Le microbe n'étant capable de végéter qu'aux dépens de la cellulose, tout son métabolisme a pour base exclusive la dégradation de ce produit. Quelles en sont les conditions physiologiques essentielles? Quel en est le caractère et quel en est le produit?

Sa dépendance de la présence d'azote assimilable a été bien mise en relief par les travaux antérieurs. Hutchinson et Clayton ont noté la supériorité des substances inorganiques comme sources d'azote dans ce cas. Plusieurs expériences avec un sel ammoniacal leur ont donné un rapport d'azote consommé à la cellulose décomposé sensiblement égal à 1 : 30. Waksman, dans ses expériences avec de la terre additionnée de papier moulu, a démontré qu'en général la décomposition de la cellulose y est fonction de l'azote assimilable.

Une seconde condition est celle de l'aérobiose, également déjà notée, par Hutchinson et Clayton, mais ce n'est que le fait que la décomposition du papier ne marche qu'à la surface du liquide et non à l'intérieur qui leur a servi d'indice.

Quant aux produits, la culture en solution additionnée de sel ammoniacal deviendrait acide au tournesol au bout de huit à dix jours et cette acidité serait due à l'acide butyrique, dont la production atteindrait 7 à 9 p. 100 de la cellulose ajoutée.

La production de mucilage jaune serait un autre fait régulier dans les cultures en solution; apparaissant à la surface, autour de la matière cellulosique, il rendrait tout le liquide mucilagineux. Le liquide de culture ne possède aucun pouvoir réducteur; après hydrolyse par l'acide chlorhydrique il se montre dépourvu d'activité optique. Il ne contiendrait donc aucune substance de nature cellulosique. Le mucilage possède par contre « quelques points de ressemblance » avec les substances pectiques : séché dans le vide, il est légèrement soluble dans l'eau froide, beaucoup plus dans l'eau chaude; il est précipitable par l'alcool; l'acide chlorhydrique transforme ses solutions en gelée. D'autre part, le même acide dilué et chaud y donnerait un précipité insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'ammoniaque.

Les auteurs concluent qu'en supposant l'existence d'un produit pareil dans le sol, il entrerait, en suivant la méthode conventionnelle d'analyse, dans la fraction *humus*.

En appliquant l'épreuve du bain de méthylène, on s'assure

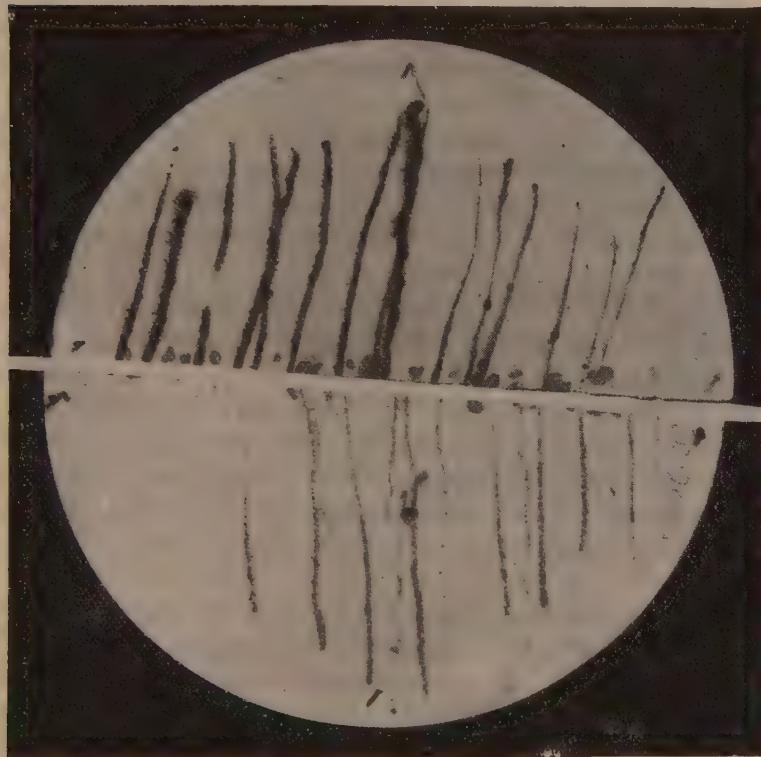


FIG. 2. — Rond de papier ensemencé en stries et soumis au bout de quelques jours de culture à l'épreuve du bain colorant. Moitié grandeur naturelle.

que l'action des *Cytophaga* sur les fibres est essentiellement une action oxydante, à la suite de laquelle elles se chargent d'une substance leur communiquant les réactions mentionnées de l'oxycellulose. La meilleure manière de l'appliquer est de faire quelques stries d'ensemencement sur un rond de papier étendu sur la plaque de silico-gel, de garder celle-ci quelques jours à

l'étuve, sans permettre une gélification avancée, de l'enlever, de le sécher, de le colorer dans un bain de bleu de méthylène à 0,05 p. 100. Après lavage de vingt-quatre heures, les stries y apparaissent en bleu indigo presque noir, teinte reproduite sur la planche en couleur fig. 23, tandis que les interstices ne gardent qu'une teinte azur très claire. La figure sur la page précédente représente un filtre de 150 millimètres ensemencé en stries très fines, enlevé au bout d'environ six, sept jours et traité comme il a été dit. Les stries s'y dessinent en couleur intense, mais seulement du côté libre de la feuille, tandis que du côté tourné vers le gel elles n'apparaissent que faiblement marquées. Les figures 23 et 25. pl. V reproduisent en couleur la différence que l'on constate après l'épreuve du bain de méthylène, entre la coloration de la face supérieure d'un morceau de papier et sa face inférieure, après ensemencement et séjour de quelques jours à l'étuve. L'expérience, si simple, est bien démonstrative pour mettre en relief le degré d'aérobiose qu'exige le processus d'oxydation, lequel n'est actif qu'en contact immédiat avec l'air; car on voit que l'épaisseur d'une mince feuille de papier suffit déjà pour l'enrayer. Elle montre enfin, que la culture en milieu liquide est non seulement défectueuse au point de vue de la technique à employer dans ce cas, mais qu'elle est réellement préjudiciable à un développement normal du processus.

La réaction classique de l'oxycellulose est donc des plus marquées sur les fibres envahies par les *Cytophaga*. Par contre, ces fibres à cet état partiellement oxydés, soumises à l'épreuve de la réduction dans la liqueur de Fehling, n'en donnent aucune trace.

Comme il a été dit, la fibrolyse sur les plaques à marche normale est complète, et la masse gélantineuse qui en résulte en est le produit stable. Pour l'enlever de la surface de la plaque, on la couvre avec une couche d'eau et on la détache en se servant d'une spatule en porcelaine; on prend, bien entendu, toutes les précautions pour ne pas déranger la surface du gel silicique. Le liquide trouble, plein de grumeaux jaunes, est jeté dans un verre; en chauffant à l'ébullition, les grumeaux se délayent, et on a une suspension vivement colorée en jaune d'œuf, mucilagineuse, opaque. Elle ne s'éclaircit même pas à la suite d'un

chauffage prolongé, ce qui montre que la *substance n'est que dispersible dans l'eau*, très légèrement dans l'eau froide, beaucoup plus dans l'eau chaude. Une coagulation a lieu dans ces suspensions, mais avec une extrême lenteur, au bout de quelques jours, et elle reste incomplète. Pendant ce temps, le liquide se décolore complètement en ne gardant qu'une teinte faiblement jaunâtre. Chauffé à l'ébullition il se laisse filtrer au moyen de la trompe, mais assez lentement. L'alcool précipite ces suspensions, en formant un dépôt blanc. La soude à 1 p. 100 dissout le produit gélatineux à froid, plus rapidement à chaud. Il en résulte une solution claire, qui garde une teinte jaune pendant plusieurs jours, sans se décolorer. En ajoutant de l'acide chlorhydrique goutte à goutte à la solution alcaline, on voit des flocons ou un trouble apparaître déjà à l'approche de la neutralisation. A l'acidification, le trouble s'accentue, et un précipité jaune se forme immédiatement, ou au bout de quelques heures.

L'emploi de chiffons, au lieu du papier, permet d'isoler facilement la matière jaune produite par l'oxydation des fibres. On laisse environ 1 gr. 5 de chiffons ensemencés sur la plaque de silico-gel jusqu'à ce qu'ils apparaissent enduits d'un mucus jaune. Sans leur donner le temps de devenir gélatineux, on les enlève au moyen d'une pince et on les jette dans 50 cent. cubes de soude à 1 p. 100; on chauffe jusqu'à l'ébullition en agitant avec une baguette; on filtre sur un entonnoir Buchner en usant de la trompe et on obtient une solution qui présente les caractères ci-dessus notés. Les chiffons, redevenus blanc pur, sont lavés sur filtre avec de la soude à 1 p. 100 bouillante et ensuite copieusement avec de l'eau chaude. Ils apparaissent plus ou moins raréfiés et effilochés, mais ce résidu n'est que de la cellulose pure, sans aucune trace de la substance qui leur conférait les propriétés de l'oxycellulose. On s'en assure le plus simplement au moyen du bleu de méthylène: ils ne retiennent plus la coloration, on ne constate pas la moindre différence entre leur teinte et celle des chiffons normaux.

La méthode des chiffons permet de mesurer facilement l'énergie du processus, ou son rendement, par le poids de la cellulose disparue au bout d'un temps donné. Il n'y a qu'à prendre le poids exact des chiffons avant de les étendre sur

le gel, de les sécher ensuite sur filtre taré après le lavage indiqué.

EXEMPLES :

- 1^o 1 gr. 53 étalés le 27 février, enlevés le 2 mars.
Reste 1 gr. 08, soit perte 30 p. 100 au bout de trois jours.
- 2^o 1 gr. 57 étalés le 28 février, enlevés le 6 mars.
Reste 0 gr. 80, soit perte environ 50 p. 100 au bout de six jours.
- 3^o 1 gr. 54 étalés le 6 mars, enlevés le 11 mars.
Reste 0 gr. 94, soit perte 38 p. 100 au bout de cinq jours.
- 4^o 1 gr. 54 étalés le 6 mars, enlevés le 14 mars.
Reste 0 gr. 67, soit perte 56 p. 100 au bout de huit jours.
- 5^o 1 gr. 51 étalés le 8 mars, enlevés le 21 mars.
Reste 0 gr. 31, soit perte 1 gr. 20 ou 80 p. 100 au bout de treize jours.

On voit que le rendement du processus dans ces conditions est notable.

Notons enfin que ni l'extrait des fibres oxydées, ni le gel silicique des plaques, soumis à l'hydrolyse au moyen d'acides forts, ne donnent lieu régulièrement à aucune réduction dans la liqueur Fehling. Une seule fois, on a constaté, à la suite de l'hydrolyse, une réduction notable, mais ce n'était qu'une exception, et on n'est pas encore fixé sur sa raison.

Hormis ce gel organique, nous n'avons réussi à trouver aucun autre produit. En ajoutant aux fibres oxydées, ou à leur extrait alcalin, ou enfin au gel silicique des plaques, réduit en poudre, de l'acide sulfurique et, en distillant, on n'a jamais constaté aucun produit volatil d'aucun genre. Le distillat donnait les mêmes réactions que l'eau distillée du laboratoire et, au compte-gouttes, les mêmes cent gouttes que cette eau.

Nous ne pouvons donc confirmer la production notable d'acide butyrique rapportée par Hutchinson et Clayton. La raison de cette divergence est-elle à chercher dans les conditions de culture dans le milieu liquide, dont la surface se couvrait de végétations avides d'oxygène, d'où résultait une anaérobiose complète dans les couches sous-jacentes du liquide, conditions favorables pour faire pulluler quelques germes anaérobies latents ? ou la production de cet acide est-elle spéciale à l'association *Cytophaga-Coccus*, qui peuplait leurs cultures ? Il est encore impossible de le dire.

CYTOPHAGA AURANTIACA. — Elle doit son nom spécifique aux taches d'un rose-orangé vif qu'elle produit sur le papier. Moins répandue que l'espèce de Hutchinson, elle est facilement repérable sur les cultures spontanées à cause de cette teinte vive et de la fibrolyse intense qui a lieu sous ces taches ou colonies. Le moindre point coloré qui apparaît est déjà diaphane dès le premier jour, ce qui n'est pas banal avec ces organismes.

Il n'est pas rare que ces zones oranges, entourant les grains de terre, soient composées de végétations aussi homogènes qu'on pourrait le désirer. En les examinant, on ne trouve que ça et là quelques formes étrangères, évidemment à l'état de repos, car elles apparaissent isolées entre les masses des *Cytophaga*.

Le photogramme pl. VI, n° 2, qui illustre le peuplement d'une de ces zones, où l'on ne voit que quelques formes étrangères, en donne une idée très précise.

La forme des petits filaments, acuminés, souvent sinueux, mais sans torsion ou très rarement, répète exactement celle de l'espèce précédente. Ce n'est que la taille qui diffère, atteignant presque le double de l'autre ; soit, longueur maxima 6 à 8 μ , épaisseur au milieu se rapprochant de 1 μ . Ce caractère, joint au caractère macroscopique de la teinte rose-orange la différencie comme une souche à part. Ces caractères différentiels sont restés parfaitement constants durant toute la durée de la culture comportant plusieurs dizaines de repiquages. Le repiquage, réduit à un attouchement au moyen d'une baguette étirée en fil, donne naissance au bout de deux jours à des petits points rose orange, comme on les voit sur la planche en couleurs, figure 16 ; en les piquant, on tire des stries sur le papier, qui se dessinent au bout du même délai avec la même teinte (fig. 18). Si l'on se tient à cette manipulation délicate, les germes du microbe sont assez dispersés pour produire de minuscules petites colonies aussi isolées qu'il est nécessaire pour un repiquage ; malgré cela, on n'arrive jamais à obtenir des végétations du microbe complètement exemptes de germes étrangers.

Les stries se couvrent bientôt d'un mucus coloré, qui leur donne un aspect gras. Elles s'étendent, en produisant quelquefois des marbrures rose orange, comme on le voit sur la

figure 11, jusqu'à ce que la feuille entière se soit transformée en une couche de gel orange, parfaitement homogène et transparente, mais apparemment plus dense, moins bombée qu'avec l'espèce précédente. Comme avec celle-ci, le gel se décolore au bout de peu de jours.

Son mode d'attaque des fibres est également identique à celui qui a été déjà décrit. La forme étant plus forte, mieux colorable et plus facile à épurer, c'est dans ses cultures qu'il est particulièrement instructif de le suivre. Ainsi le photogramme pl. VII, n° 3, présente une fibre tout au début de l'attaque, prise dans une culture très jeune ; les filaments du microbe y sont encore clairsemés, mais on voit les individus gardant quelque distance l'un de l'autre et disposés à peu près parallèlement ; sur la fibre du n° 4, pl. VI, le revêtement microbien est presque complet, mais sa « structure » reste la même ; enfin, sur le photogramme n° 3, pl. VI, le revêtement massif, déjà vide de fibre et non soutenu par elle, apparaît curieusement ébouriffé, tableau caractéristique et très fréquent dans les préparations. Très caractéristique est également le lambeau d'un revêtement dérangé par la préparation qu'illustre le n° 2, pl. VI.

Il n'y aurait rien à ajouter touchant les questions non résolues de la motilité et de la sporulation. La condensation de la matière chromatique dans la partie médiane est particulièrement bien marquée sur le photogramme ci-dessus indiqué.

Avec cette espèce, dont le développement est plus lent et moins massif, on n'a fait que l'épreuve du bain colorant qui a donné un résultat des plus décisifs.

Nous ne mentionnerons qu'en passant les autres espèces pour montrer qu'il s'agit bien de tout un groupe ou genre composé d'un nombre de souches ou d'espèces.

CYTOPHOGA RUBRA. — Forme acuminée, droite, parfois légèrement arquée ou avec une sorte de petit crochet à l'une des extrémités ; pas plus longue que la forme de Hutchinson, soit 3μ , mais plus trapue. En somme, la forme est intermédiaire entre les espèces précédentes et les vibrions. De même son action sur le papier, qui se colore d'une teinte rose brique sous ses stries (voir fig. 10, pl. V), mais la fibrolyse est loin d'être aussi

marquée qu'avec les espèces précédentes : les stries se dessinent diffuses (voir fig. 19); elles sont envahissantes; de même que celles qui sont produites par l'action des vibrions, comme on le verra tout à l'heure. La fibrolyse apparaît tout de même tardivement, pas avant l'envahissement du rond entier, qui se transforme finalement en film rougeâtre presque identique à celui que nous venons de décrire.

L'espèce a été maintenue en culture pendant plus d'une année, mais un assez fort mélange d'un petit bâtonnet s'y maintenait obstinément, ce qui rendait désirable un nouvel isolement qu'on n'a pas eu le loisir d'exécuter.

CYTOPHAGA LUTEA. — L'espèce paraît assez rare; elle n'a été isolée qu'une seule fois de la terre d'un pré. Forme aussi longue que l'espèce orange, plutôt plus longue et plus élancée, sans renflement bien accusé au milieu, à bouts pointus, à peine sinuueuse ou arquée, jamais enroulée en spirale (voir pl. VII, n° 5). Le mucus qu'elle forme est d'un jaune brillant comme celui de la forme de Hutchinson. Elle a été isolée à l'état presque pur et maintenue en culture pendant deux mois.

CYTOPHAGA TENUISSIMA. — Originaire de l'humus brut d'une terre de forêt de Suède. Diffère des autres par son extrême ténuité. Le photogramme 4, pl. VII, la montre logée sur une fibre. Le mucus qu'elle forme est d'une teinte verdâtre ou olivâtre.

LES ASSOCIATIONS DES CYTOPHAGA AVEC DES COCCUS. — Ces associations paraissent assez répandues dans la nature. L'une d'elles, trouvée dans la terre de Rosthamsted, a fait le thème de l'étude si souvent citée. Nous l'avons trouvée la première fois dans une terre exotique, mais depuis elle est apparue assez souvent dans nos cultures spontanées des terres de Brie.

La question reste ouverte de savoir si ces espèces cocciformes, dont nous avons observé deux, sont capables d'agir directement sur la cellulose fibreuse, car elles ne pullulent qu'en compagnie de l'une ou de l'autre souche du groupe des *Cytophaga*. Les tentatives, pourtant assez nombreuses, d'isoler ce coccus, n'ont pas encore réussi. L'échec était inattendu, car les

commensaux des organismes spécifiques de la cellulose pullulent ordinairement assez volontiers sur des milieux contenant des sucres, de l'amidon ou des milieux peptonés, tandis que les *Cytophaga* s'y refusent absolument. La séparation paraissait donc facile. Si elle a échoué, c'est justement parce que ces espèces cocciformes s'y sont refusé également. En se servant des quatre milieux cités p. 564, on n'est jamais parvenu à avoir des cultures de ces coccus. On ne peut qu'en déduire qu'ils sont spécifiques eux aussi et on serait conduit à poser la question déjà posée antérieurement : lequel des deux microbes associés est responsable de la dégradation, si l'examen microscopique suivi des cultures mélangées n'enseignait très clairement que ce sont les *Cytophaga* qui y jouent le premier rôle?

En effet, si l'on s'astreint à suivre le développement d'une telle culture dès le début par des examens microscopiques répétés, il est facile de saisir que la pullulation des *Cytophaga* précède celle des coccus; on trouve les fibres déjà revêtues, exactement comme le montrent nos photographies, tandis qu'à ce moment les coccus se présentent isolés, peu nombreux, non encore en chaînettes ou groupes, et sans jamais se loger sur les fibres. A mesure qu'avance la fibrolyse, les coccus deviennent de plus en plus nombreux, et leurs pullulations d'un caractère particulier — qu'on pourrait désigner de *strepto-staphylococcique* — commencent à recouvrir en masse les fibres déjà revêtues de *Cytophaga*.

Enfin, à l'autolyse de ces derniers, les masses imposantes de ce coccus composent à elles seules toute la culture, que l'on dirait pure à l'examen microscopique. De fibres, il n'en reste plus alors aucune trace, sauf des traînées faiblement colorables d'un gel dépourvu de toute structure (voir pl. VII, n° 7); sa comparaison avec la figure 4, planche III, du mémoire de Hutchinson et Clayton ne laisse aucun doute sur l'identité du microbe cocciforme de Brie avec celui de Rothamsted.

De ces observations il paraît permis de conclure que ce sont les *Cytophaga* qui attaquent directement les fibres encore saines, car on les voit à l'œuvre, non seulement les premiers, mais gardant leur position, autant que l'on peut en juger, jusqu'à la désorganisation des fibres. Il est donc probable que les coccus ne pullulent qu'aux dépens du produit de cette

désorganisation. Poursuivant cette idée, on a préparé un milieu gélosé avec une suspension aqueuse épaisse de gel Cytophagique additionné d'azote et de sels, mais le coccus n'y a pas pullulé non plus; ce qui ne conduit pas encore à rejeter l'idée d'une utilisation des produits de dégradation, car ce pourrait être quelque produit intermédiaire, quelque dextrine ou mucus cellulosique qui leur sert d'aliment, et non le produit définitif, stable.

Le gel de ces associations est différent de celui qui est produit par les *Cytophaga* non associés. Il n'en a ni la teinte brillante, ni la transparence. Le plus souvent il est d'un jaune chamois ou chocolat clair (voir carré 12, pl. V). Sur les vieilles plaques il a l'aspect d'une sorte d'onguent brun; préservé de la dessiccation, il reste des mois sans changement, et on y trouve toujours les coccus en quantité. Étendu sur plaque silico-gel-papier, il reproduit le même mélange, à la condition d'en prendre une assez forte dose.

Ce coccus n'est pas le seul que l'on trouve associé au *Cytophaga*. Le photogramme 2, pl. VII, reproduit une autre combinaison que l'on ne manque pas d'observer en travaillant d'après la technique décrite. On y voit un gros coccus de forme un peu allongée, ovalaire, entourant une fibre désorganisée par les *Cytophaga* et pénétrant dans le revêtement déjà vide formé par ces dernières. Il se distingue de la forme streptococcique par sa forme allongée, par sa taille plus forte et parce qu'il ne pullule pas en chaînette. Le gel produit dans ses cultures est parfois abondant et d'une teinte rouge cerise.

LES CELLVIBRIONS A TEINTE JAUNE-OCRE. — Ces vibrions sont très fréquents dans des terres de bonne culture, régulièrement fumées. On les voit apparaître au bout de deux-trois jours sur les cultures spontanées, pour couvrir bientôt par leurs zones jaunes le rond entier. L'une de ces espèces qui paraît la plus active a été soumise à une étude plus complète. Nous en donnons la caractéristique sous le nom de *Cellvibrio ochracea*, à cause de la teinte ocreuse qu'il communique aux fibres et qui est son caractère macroscopique constant (voir carré 4, pl. V).

Son isolement est assez aisé, à cause de ses pullulations rapides et envahissantes, qui devancent facilement les compé-

titieurs en leur coupant l'accès des fibres envahies. Trois ou quatre repiquages suffisent ordinairement pour avoir des cultures homogènes et se maintenant telles, sans autre précaution que de ne pas les laisser vieillir.

Morphologie et culture. — Sa forme est celle d'un bâtonnet à bouts arrondis, long de 2 à 4 μ au maximum, arqué parfois mais rarement, un peu tortu en spirale, légèrement plus épais au milieu qu'aux extrémités. On remarque souvent un grain chromatique au milieu, dans la partie moyenne du bâtonnet (photogramme n° 1, pl. VIII).

Les individus sont munis d'un cil; examinés à l'ultra-microscope, leurs mouvements sont impressionnantes par leur intensité (voir n° 2, pl. VIII).

Cultivé sur le milieu type, il frappe par la rapidité avec laquelle il s'étend sur le papier en lui communiquant une teinte ocre assez claire. Les stries d'ensemencement que l'on tire sur le rond papier, très fines, se dessinent au bout de vingt-quatre heures, ayant déjà en largeur 1 à 2 centimètres. Un filtre de 150 millimètres de diamètre sur lequel on tire 3-4 fines égratignures avec le bout d'un fil de platine après avoir touché un filtre infecté, apparaît entièrement jaune ocre au bout de quarante-huit heures déjà. On s'assure, par l'examen microscopique, que cette teinte n'apparaît sur les fibres qu'à la suite de l'envahissement par le vibron. En effet, d'où que l'on arrache un flocon de fibres sur la surface jaunie pour l'examiner au microscope, on trouve toutes les fibres couvertes par ses masses imposantes. On ne retrouve pas l'aspect d'un revêtement aussi régulier que chez les *Cytophaga*; ils n'y sont probablement pas incrustés, comme ces dernières; ils s'en détachent facilement, mais leurs masses paraissent bien suffisantes pour bourrer tout l'enchevêtrement des fibres du papier. Le rond entier devient ainsi une colonie du microbe atteignant 150 millimètres de diamètre. Envahir au bout de quarante-huit heures une couche de cette dimension, et cela au sein d'un milieu solide dépourvu de tout excès d'humidité, accuse une énergie d'expansion, dont il serait difficile de retrouver l'exemple parmi les groupes connus des bactéries. Le vibron ocre, ainsi que ses congénères dont il sera question dans la suite, apparaissent donc comme des *spreaders*, des envahisseurs, hors ligne.

Il n'y aurait pas beaucoup à dire de son cycle de développement. La seule différence entre les cultures jeunes et les cultures âgées, c'est que les premières présentent des articles plus longs et plus arqués; tandis que la fragmentation qui se poursuit dans les cultures âgées conduit à des articles très courts (environ 1,5 sur 1 ou au-dessous). A la reprise, ils reproduisent la forme jeune.

On n'a pas observé d'autolyse, ni de sporulation.

Les tentatives de culture sur les quatre milieux gélosés sans cellulose ont échoué : le microbe a refusé de pulluler aux dépens de la peptone, du glucose, de l'amidon, de la gomme adragante; il est sans action sur la gélose pure.

Il pullule assez vigoureusement sur le milieu gélosé à hydrocellulose, mais d'une manière inattendue. On ensemence en surface, en y déposant une goutte d'une suspension du microbe, que l'on étend au moyen d'une baguette courbée ou d'une anse à plat; on laisse ensuite la plaque de Petri pendant deux heures à l'étuve sans couvercle, non seulement pour évaporer la couche d'eau capillaire, mais pour durcir la surface de la gélose, autant que cela est possible sans que des fissures se produisent: ceci, pour bien fixer les germes sur place et pour provoquer leur pullulation en colonies séparées et bien délimitées.

Il n'en est rien. Durant six-sept jours, on ne remarque aucun changement sur la plaque opaque, blanche comme porcelaine. Puis un ton jaune apparaît, diffus dans toute la masse qui s'accentue jusqu'à présenter la teinte ocre caractéristique pour le microbe; il n'y a ni colonies distinctes, ni trace de zones d'éclaircissement, que l'on pourrait attribuer à une action enzymatique. Dans la suite, on ne remarque plus aucun changement, si ce n'est que la surface de la gélose perd son brillant et devient un peu chagrinée, évidemment à cause de petits affaissements qui résultent d'une diminution de la masse des débris des fibres enrobées dans la gélose. L'examen microscopique de la gélose jaunie apprend que le milieu est entièrement et uniformément pénétré par des masses du vibron, dont on reconnaît les caractères.

Ce fait que l'on a constaté sur toutes les plaques à hydrocellulose, dont on a préparé deux séries, peut-il s'expliquer par une locomotion assez énergique pour vaincre la résistance du milieu solide ou par la pression exercée par les pullulations

qui forcent leur passage d'un débris à un autre, il est bien difficile de le dire. Il témoigne de nouveau d'une faculté d'expansion extraordinaire de ce Vibrion.

Action oxydante. — Quant à son action oxydante sur les fibres, elle est particulièrement rapide. On s'en assure en traçant des stries sur un filtre que l'on ne laisse qu'environ vingt-quatre heures sur la plaque. Le rond enlevé, séché, coloré au bleu de méthylène et lavé, les stries s'y dessinent déjà en bleu



FIG. 3. — Rond de papier ensemencé en stries par le vibrion et soumis au bout de vingt-quatre heures de culture à l'épreuve du bain colorant. Moitié grandeur naturelle.

indigo intense, tandis que les interstices restent clairs (voir fig. III). On remarquera sur la figure que les taches ont un caractère différent de celles qui sont causées par les Cytophages : tandis que celles-ci sont étroites et nettement contournées, celles du Vibrions sont diffuses, estompées, ce qui correspond exactement au mode différent de pulluler et d'agir sur les fibres des deux groupes : action localisée, complète chez le premier, action superficielle, rapide, expansive chez le dernier.

Pour donner une idée complète du métabolisme propre à ce microbe, nous rapportons une analyse d'une grande plaque silico-gel-papier d'après la méthode décrite :

Rond papier, en grammes	1,19
Nitrate de potasse en grammes	0,200
pH initial 7,2. Durée de culture : quarante jours à 30°.	

Papier réduit à une pellicule jaune assez sèche, non diaphane, qui contient encore beaucoup de débris de fibres. On parvient à la détacher sans perte. Lavée à l'eau froide — jusqu'à épreuve négative avec du nitrate d'argent, de la liqueur Nessler et de la diphénylamine sulfurique — et séchée, le reste pèse 0 gr. 44. Donc disparu 0,75 ou environ 62 p. 100. Une partie de ce reste qui contient toute l'oxycellulose, dont les fibres se sont chargées, est employée pour la détermination du chiffre cuprique, l'autre pour un dosage d'azote organique d'après Kjeldahl :

Avec 0,165 de matière on ne constate pas la moindre trace de réduction. Le dosage Kjeldahl montre que le reste contient 6 milligr. 2 d'azote, soit environ 1,5 p. 100.

Le gel, séché, passe à l'état de gravier jaune; on en note le poids total. On le réduit en poudre impalpable, qu'on épouse avec de l'eau bouillante, jusqu'à ce qu'il perde sa teinte jaune et ne se présente que comme un sable blanc. On répète les trois épreuves citées, pour s'assurer qu'il n'y a plus de sels solubles.

L'extrait des fibres à l'eau froide est opalescent, presque incolore (1). L'extrait du sable est jaune, opalescent également (2); les deux sont ramenés à 500 cent. cubes chacun.

On éprouve le pH par la méthode colorimétrique. Celui du liquide 1 est 7,2; celui du liquide 2 est 8,0.

Les deux, éprouvés par la liqueur Nessler, donnent une réaction positive.

La diphénylamine produit un bleuississement intense.

On dose l'azote ammoniacal et nitrique en prenant 100 cent. cubes des deux extraits par la méthode Dewarda. L'azote ammoniacal se montre indosable par cette méthode. Le résultat du dosage de l'azote nitrique multiplié par 5 donne 12 milligr. 9 comme reste d'azote soluble dans la culture.

L'azote consommé est donc 14 milligr. 8, ce qui fait environ 2 p. 100 de la cellulose disparue.

On soumet la même dose des deux liquides, soit 100 + 100 à la distillation acide après addition de 10 grammes d'acide sulfurique. On recueille 150 cent. cubes d'un distillat sans la moindre odeur, ne rougissant pas le tournesol, virant avec l'alizarine sulfonate à la première goutte d'une solution N/35 de baryte, donnant au compte-gouttes les 100 gouttes de l'eau distillée. En réalité, il n'est que celle-ci qui ne contient aucune trace de produits volatils.

Pour l'épreuve de la réduction, on prend à nouveau 200 cent. cubes des deux liquides que l'on concentre au bain-marie jusqu'à 50 cent. cubes. On ne trouve pas la moindre trace de réduction.

Hydrolysé par une longue ébullition avec l'acide sulfurique, le même mélange n'en manifeste également aucune.

Pour établir la balance complète de l'azote, on dose l'azote organique encore dans le sable par la méthode Kjeldahl et dans les extraits 1 et 2. Le sable silicique n'en contient que 1 milligr. 6. Pour doser cet azote dans les extraits, — lesquels ne sont pas des solutions parfaites, mais, des solutions colloïdales, ce que montre leur opalescence, — on évapore à sec dans une capsule 200 cent. cubes du mélange des deux extraits, on couvre le résidu avec de l'acide sulfurique concentré et on chauffe aussi longtemps que nécessaire pour chasser tout l'acide nitrique. On transvase ensuite l'acide sulfurique dans un ballon Kjeldahl et on lave soigneusement la capsule avec de petites doses du même acide concentré. On trouve ainsi dans les extraits 6 milligr. 29 d'azote organique.

Le bilan de l'azote est donc, en milligrammes :

Retrouvé :	Azote initial : 27,7.
Azote nitrique	12,9
Azote organique, fibres	6,2
— liquide	6,3
— sable	4,6
Total	27,0

En mettant en regard le chiffre de l'azote nitrique disparu qui est 14,8 avec celui de l'azote assimilé qui est 14,1, l'accord est satisfaisant.

Concernant les résultats de cette analyse qui sont typiques pour le microbe, il n'y a qu'une remarque à faire : c'est qu'en hydrolysant les extraits aqueux que nous avons mentionnés, l'épreuve de la réduction n'est pas toujours négative. Quelquefois le liquide hydrolysé vire au jaune à l'alcalinisation et montre un pouvoir réducteur dosable, qui s'est élevé dans quelques cas à 15 milligrammes de protoxyde total; ou calculé en dextrose environ 8 milligrammes de ce sucre. Il paraît donc que la culture contient parfois une substance de nature cellulosique dispersible dans l'eau.

En employant, au lieu du papier, des chiffons que l'on ne tient que quelques jours sur la plaque, on s'assure, comme dans le cas précédent, que les fibres oxydées perdent la substance qui leur confère la propriété de l'oxycellulose par simple lavage. L'eau bouillante en extrait presque la totalité.

En enlevant de la plaque des chiffons d'un poids initial de 1 gr. 5 au bout de cinq à six jours, et en les faisant bouillir dans 50 cent. cubes d'eau, on a une suspension jaune, fortement opalescente, qui laisse quelque dépôt colloïdal au bout de deux à trois jours, en se décolorant presque complètement. On l'utilise entièrement avec le dépôt pour une épreuve de réduction, mais on n'en trouve pas la moindre trace.

On ajoute à la même suspension filtrée 10 grammes d'acide sulfurique concentré et on fait bouillir, réfrigérant vertical, pendant deux heures. L'épreuve de réduction donne également un résultat négatif.

En soumettant des chiffons oxydés, non entièrement jaunis, mais couverts de taches jaunes, à l'épreuve du bain colorant,

on distingue très nettement que le colorant basique n'est retenu que par le tissu jauni, mais non par les parties restées encore blanches.

Lavés à l'eau bouillante, ces chiffons sortis du bain colorant se décolorent au lavage, sauf quelques petites taches, comme les chiffons neufs. Après lavage à la soude 1 p. 100, on ne voit plus de taches; les chiffons en sortent plus pâles que les chiffons neufs, à cause de leur texture raréfiée.

Pour mesurer la rapidité de la dégradation, c'est donc le lavage à la soude étendue qu'on emploie.

Grande plaque, avec 1 gr. 50 chiffons.

Séjour à l'étuve à 30°, six jours.

Lavés à la soude 1 p. 100 et à l'eau bouillante, recueillis sur filtre taré, séchés, le poids est à 1 gr. 21, soit environ 20 p. 100 de perte.

On replace sur la même plaque 1 gr. 55 de chiffons neufs.

Séjour à 30°, dix jours.

Même traitement. Poids : 1 gr. 26, soit perte 19 p. 100.

Toutes ces observations conduisent à la conclusion que l'efficacité de l'action du vibrion est beaucoup au-dessous de celle de *Cytophaga*. Elle est surtout envahissante, mais moins profonde, s'arrêtant à un moment quand la proportion de la cellulose est encore relativement considérable.

Le nombre des souches produisant sur le papier cette teinte jaune-ocre paraît assez grand. La teinte est tantôt plus foncée, comme le carré 4 de la planche en couleur, tantôt plus claire; on trouve encore la différence qui consiste en ce que les unes agissent sur les fibres sans produire de mucus, tandis que les autres en produisent assez abondamment. Ce mucus, qui englobe les restes des fibres disjointes jaunies, est incolore et assez liquide pour s'égoutter sur le couvercle de la boîte de Petri, si on la tient renversée.

Sans tenter cette fois d'en donner les caractéristiques, nous nous bornerons à attirer l'attention sur une seule souche maintenue en culture à plusieurs reprises et épurée jusqu'à uniformité complète.

La forme ressemble beaucoup à celle du vibrion que l'on vient de décrire: la taille est seulement plus petite et la couleur moins marquée, de sorte qu'elle apparaît parfois comme

un bâtonnet grêle, presque droit. La teinte du papier est ocre très clair, et il y a quelque production de mucus (voir pl. V, carré 3 et pl. VIII, n° 2).

LE CELLVIBRION A TEINTE CRÈME. — Ce vibron dont le nom latin pourrait être *Cellvibrio flavescent* présente des caractères bien particuliers qui le différencient du groupe précédent. Son action sur la cellulose est nettement marquée, mais celle-ci n'est pas son aliment exclusif, car il se montre capable de pululer aux dépens de différents autres aliments, ce qui rend son isolement facile.

Morphologie et culture. — Il a été isolé la première fois d'un tas de vieille sciure humifiée et il a été maintenu en culture sur des milieux variés pendant plus de trois ans.

Cultivé sur le milieu type, la teinte qu'il communique au papier est faible, mais caractéristique : c'est une *teinte crème* ; on ne saurait la définir autrement. On la trouve reproduite sur le carré 1 et 2 de la pl. V. Au début des pullulations elle est comme 1, plus tard un peu brunâtre, comme 2. Jamais on n'a vu ce vibron en produire d'autre sur le papier.

La marche des cultures sur le même milieu est presque aussi rapide que celle du vibron ocre. Il n'est pas rare qu'un rond de 150 millimètres prenne entièrement la teinte habituelle au bout de quarante-huit heures d'étuve, à la suite de quelques stries tracées sur sa surface. D'ordinaire, les stries ne se dessinent pas sur le papier aussi clairement que dans le cas précédent, en marquant la marche envahissante du vibron. Ici le rond est souvent encore sans modification apparente au bout de quarante-huit heures, particulièrement si on fait l'ensemencement en déposant au centre du rond un flocon minuscule de fibres infectées. Mais en arrachant de petits flocons de fibres à la périphérie du rond, on s'assure que les vibrons y sont déjà présents en quantité notable, sans que leur pullulation se traduise encore par quelque caractère macroscopique. Ce qui est particulier, c'est qu'on les trouve assez souvent dans le canal des fibres qu'ils paraissent tapisser, attirés probablement par les résidus protoplasmiques de ces cellules mortes. Ainsi peuplé, le rond ne tarde pas à prendre la teinte coutumière : au troisième jour on le trouve entièrement et uniformément jauni.

En suivant le développement du vibron, on trouve des analogies indéniables avec celui des *Cytophaga*. Il est probable, à en juger par la structure des agrégats qu'on trouve dans les préparations, qu'ils se tiennent également sur les fibres en formant une espèce de revêtement, mais sans s'y incruster, de sorte qu'ils en sont facilement détachables.

Jeunes, leur forme est celle de bâtonnets flexueux, non acuminés, longs de 2,5 à 5 μ , grêles, n'excédant pas 0,5 μ d'épaisseur. A cet état, ils se colorent vivement lorsqu'on emploie la méthode indiquée. Ils sont mobiles et possèdent un cil unique comme le vibron ocre (pl. VIII, n° 4).

Au cours du vieillissement, on commence à trouver, entre les formes vibronniennes, des corps sphéroïdaux pâles et mal délimités, du même aspect que chez les *Cytophaga*. On les distingue parfaitement aussi longtemps qu'ils sont isolés et relativement rares. Mais avec l'âge leur production devient massive, et leur consistance étant évidemment plus molle que chez *Cytophaga*, ces *coccoïdes* s'agglutinent facilement en formant dans les préparations un fond continu à peine coloré, qui se résout pourtant par place en *coccoïdes* distincts, entièrement dépourvus de substance chromatique. Sur ce fond pâle se dessinent des vibrions ayant conservé leur forme mais ne prenant que faiblement la coloration ; ils deviennent de plus en plus rares, mais on ne les a pas vus disparaître totalement, même au bout de trois mois. Ceci pourrait expliquer la reprise relativement facile des cultures âgées chez ce microbe.

Par une série de repiquages on réussit à épurer les cultures jusqu'à un état d'uniformité satisfaisant. Il n'est pourtant pas possible de les débarrasser de cette manière de tout germe étranger. La présence de ces germes est surtout facile à constater en examinant les cultures âgées, où le fond pâle est « piqué » par des bâtonnets minuscules vivement colorés qui sont les commensaux ordinaires du vibron.

Isolement à l'état pur. — Pour s'en débarrasser, on s'adresse à la gélose peptonée (p. 564). Ensemencée en surface, elle laisse paraître au bout de vingt-quatre heures des colonies à végétation vigoureuse, composées de formes en bâtonnets très courts ne rappelant en rien les vibrions. Il faut attendre jusqu'à quatre jours à 30°, pour voir surgir entre ces grandes

colonies de petites colonies hyalines régulièrement rondes, n'excédant pas 1 millimètre de diamètre, où l'on reconnaît facilement la forme vibrionienne. On repique en tubes inclinés du même milieu et on obtient des cultures pures qui se conservent longtemps.

Le fait que ces colonies appartiennent réellement au vibrion crème est démontré, bien entendu, non seulement par les caractères microscopiques, mais par l'ensemencement sur le milieu type. On le fait avec toutes les formes isolées. Le résultat est net : seul le vibrion produit la teinte caractéristique du papier au bout de trois-quatre jours; tous les autres microbes isolés sont inactifs, laissent le papier blanc et n'y pullulent guère. Leur caractère de simples commensaux est donc bien établi.

Culture sur milieux auxiliaires. — En repiquant la culture pure sur les géloses à l'amidon ou à la gomme, la végétation n'est pas abondante, particulièrement sur le dernier milieu. Les vibrios y conservent pourtant leur caractère morphologique, et s'y maintiennent longtemps viables; tandis que sur le glucose, malgré la pullulation initiale plus abondante, les cultures deviennent bientôt stériles : des repiquages répétés ne donnent plus de culture. L'examen microscopique de ces tubes en révèle la cause : on ne retrouve plus rien du vibrion, transformé qu'il est entièrement en coccoïdes comme on le voit sur le photogramme n° 9, pl. VIII, sur lequel ces productions sont encore colorables, tandis que sur le photogramme n° 12, le processus d'autolyse paraît toucher à sa fin.

Il y a lieu d'insister sur le fait que l'impuissance de ces coccoïdes à régénérer le vibrion a été solidement établie par des repiquages, non seulement sur le milieu glucosé qui ne paraît pas favorable, mais aussi sur le milieu peptoné et sur le milieu type. Partout le résultat a été négatif. Il n'échappera à personne que ces observations, faites dans des conditions plus nettes que chez les *Cytophaga*, sont de nature à confirmer la caractéristique que nous avons donnée aux produits analogues chez ces derniers.

Enfin, comme milieu de culture, on n'a pas manqué d'essayer la gélose à hydrocellulose (p. 563), en se tenant exactement au même procédé qu'avec le vibrion ocre. On n'a eu qu'un résultat

analogue : au bout de quelques jours une teinte diffuse jaunâtre a envahi uniformément la couche entière de la gélose, sans qu'on pût saisir l'apparition ni l'extension des colonies. Le milieu, resté opaque, paraissait à l'examen microscopique uniformément rempli de masses de vibrions.

Pour en finir avec sa morphologie, on remarquera, en examinant les photographies n°s 7, 10, 11 de la planche VIII, qu'il manifeste quelque variabilité sous l'influence de l'âge et des conditions de culture. Ainsi sur le milieu type, les vibrions jeunes sont plus longs que sur la gélose peptonée. La culture aboutit, comme on l'a déjà dit, à une autolyse massive, sans que la forme filamenteuse disparaisse entièrement. Par contre, on ne trouve presque pas d'autolyse dans le mucus hyalin des cultures sur gélose peptonée; ce que l'on y constate, c'est une fragmentation de la forme filamenteuse, qui va jusqu'à sa transformation en de tout petits bâtonnets faiblement colorables. Ils régénèrent pourtant facilement la forme caractéristique du vibrion. En repiquant un tube âgé de trois mois et demi sur papier, on l'a vu prendre la teinte crème vers le quatrième jour et le papier était bourré, comme toujours dans ce cas, de vibrions à l'état de pureté.

Action sur la cellulose. — En passant à son action sur la cellulose, il importe de noter avant tout qu'elle se caractérise également comme un processus d'oxydation, ce qui est démontré facilement par l'épreuve du colorant basique. Seulement son rendement est nettement plus faible que chez les précédents; l'action est encore moins profonde et elle s'arrête en laissant plus de cellulose inchangée.

Cependant la fonction n'apparaît guère fragile, comme on l'avait affirmé, par rapport à d'autres microbes omnivores. Quel que soit le milieu où il a pullulé, ainsi que la durée de la culture, transporté sur le milieu type, il y développe sans trop de retard le processus qui lui est propre.

Pour étudier l'action du microbe sur les fibres, c'est de papier qu'il convient de se servir; il paraît plus facilement attaqué par le microbe que le tissu. On en comprend la raison en examinant l'un et l'autre au microscope : maltraitées par la fabrication de la pâte, rompues, en partie effilochées, les fibres du premier présentent certaines facilités d'attaque que

le microbe ne trouve pas dans les fibres des tissus, qui sont intactes, et protégées par leur cuticule.

Dans les expériences quantitatives avec du papier, si l'on veut atteindre le maximum d'effet, on n'a aucun indice pour se guider, quant au moment d'interrompre la culture. Comme il a été dit, la feuille prend une teinte caractéristique dès le début de l'action, mais ensuite elle ne change plus d'aspect, même si l'on garde la plaque à l'étuve durant plusieurs mois. La feuille, dépourvue entièrement de mucus, reste opaque quoique légèrement raréfiée. Au microscope, on trouve des masses de fibres désagrégées, fendues dans le sens de la longueur, une multitude de fibrilles, mais en même temps un nombre de fibres à parois épaisses et canal étroit (fibres de lin) qui restent intactes et conservent au feutrage un reste de résistance. Ainsi, en séchant la plaque telle quelle, il est possible d'en détacher la feuille — non sans pertes — en la débarrassant des écailles de silice qui y adhèrent. Elle oppose encore une certaine résistance au déchirement. Il en est tout autrement, si l'on commence par verser une couche d'eau sur la plaque : immédiatement la feuille se soulève, se gonfle et se transforme en pulpe qui surnage. Cette particularité qui permet de séparer quantitativement et rapidement toute la masse des fibres oxydées de la couche au moyen d'une faible quantité d'eau froide, qui est presque sans action sur le produit, permet de l'étudier tel qu'il sort de la culture.

On soumet les restes de la feuille ou la pulpe aux quelques réactions caractéristiques pour l'oxycellulose et l'on constate :

1^o Son pouvoir de retenir les colorants basiques, ce qui a été déjà mentionné;

2^o La coloration jaune d'or à l'ébullition avec des alcalis dilués : épreuve dont l'application serait douteuse dans d'autres cas, où une teinte plus intense des fibres envahies pourrait faire supposer la production de quelque pigment;

3^o La solubilité accrue dans les alcalis dilués : dans de la soude à 2 p. 100 à 120° pendant une demi-heure, les pertes dans une série d'expériences se sont échelonnées entre 19,6 et 26,4 p. 100. Cela ne veut pas dire que la pulpe oxydée contenait un taux d'oxycellulose aussi élevé; car les filtres de la même marque perdent à la suite de ce traitement 9 à 10 p. 100, et le liquide devient brun comme avec de la pulpe ; mais la différence de solubilité est tout de même considérable. Cette différence est plus significative, si l'on chauffe le papier sain et le papier oxydé dans de l'eau à 120° pendant trente minutes; le premier ne perd alors rien de son poids, ou quelque petite fraction de l'unité, tandis que la perte du second a varié entre 6 et 10 p. 100. C'est ce chiffre qui se rapproche plus du taux réel de l'oxycellulose dans les

fibres, car celle-ci, — ou bien, disons, la substance qui confère aux fibres les propriétés de l'oxycellulose —, est dispersible dans l'eau;

4^o Reste l'épreuve de la réduction par la liqueur de Fehling, la plus intéressante au point de vue chimique. Ici le résultat de très nombreux essais a toujours été négatif. Au début, quand on s'est borné à des essais qualitatifs, on a été induit en erreur par des traces de protoxyde de cuivre que l'on constatait sur les fibres bouillies dans la liqueur Fehling. Dans la suite, on s'est assuré que le taux de réduction était inférieur à celui du papier sain de la même marque et que même — et cela le plus souvent — ces traces de pouvoir s'annulaient par l'action du microbe.

L'enlèvement facile du reste des fibres sur la plaque présente un autre avantage qui est de pouvoir déterminer séparément la réaction du gel d'un côté, celle de la couche des fibres de l'autre, qui n'est pas la même, comme elle le serait dans une solution baignant les fibres.

En cultivant dans une solution de la même composition que celle qui imprègne les plaques avec un nitrate alcalin comme source d'azote, on constate que le *pH* initial de 7,2 atteint au bout qu'une quinzaine de jours 8,0 à 8,2.

Pour éprouver séparément le *pH* de la couche fibreuse et celui du gel, on enlève la couche fibreuse avec 100 cent. cubes d'eau froide; on chauffe jusqu'à ébullition, on filtre, on laisse refroidir; le même traitement est appliqué au gel séché et réduit en poudre; le *pH* du premier extrait est alors 7,2 à 7,6, soit sans changement appréciable, celui du second atteint 8,8 à 9,0. Si la différence est parfois moindre, elle est tout de même très notable.

Sans entrer dans le détail des phénomènes physiques compliqués qui se jouent dans ces conditions, on conçoit qu'il doit y avoir échange entre la couche fibreuse peuplée d'organismes et le gel silicique servant de réservoir pour les électrolytes nécessaires à leur pullulation, et que le sens de cet échange est déterminé par les besoins alimentaires des agents microbiens et les affinités chimiques que font naître les produits de leur métabolisme. L'équilibre est rompu aussitôt que commence la pullulation liée à une assimilation très active des ions nitriques, ce qui a pour contre-partie la formation de carbonate alcalin au sein du gel; en cas de production d'acides par les organismes, l'alcali servirait à les neutraliser, et si ces acides étaient très diffusibles, comme les acides gras volatils, le système entier, couche fibreuse avec gel, aboutirait à la même concentration

des ions hydrogène. Ceci n'a pas lieu, car il n'y a justement aucune production d'acides gras; ce qu'il y a, c'est celle d'un colloïde à caractères d'acide qui n'est pas diffusible dans le gel, ou qui ne l'est qu'à un degré infime, et c'est dans ce fait qu'il faut chercher, à notre avis, la raison d'une concentration locale des ions hydrogène dans la couche fibreuse, plus élevée qu'au sein du gel silicique.

Le fait est régulier et constant. Il est significatif, car il est le seul qui parle en faveur de la nature acide du produit de la dégradation de la cellulose dans les conditions de l'expérience; en effet, cette acidité est saturée par la base qui est libérée du nitrate alcalin, tandis qu'en employant un sel ammoniacal elle serait, par contre, masquée par la libération des ions acides, qui a lieu à la suite de l'assimilation des ions ammoniacaux.

Rapportons pour terminer deux analyses des cultures sur les grandes plaques de silico-gel, choisies comme typiques entre de nombreuses autres.

I. Rond papier : 1 gr. 23; nitrate de potasse : 0,200 ou azote : 27 milligr. 7; pH initial : 7,2.

Durée de la culture : vingt jours à 30°.

¶ Pulpe. — On enlève la pulpe au moyen d'eau froide; on lave sur filtre taré avec de l'eau chaude, on filtre, on séche.

Reste non décomposé : 0,80; soit disparu : 0,45 ou 36,7 p. 100.

Chauffés dans de la soude normale à 120° pendant une demi-heure :

La pulpe perd	17,5 p. 100
Les filtres Durieux, n° 111	12,0 p. 100

On constate des traces d'un pouvoir réducteur. On détermine le chiffre cuprique : il n'est que 0,5, tandis que celui des filtres neufs est de 1,5. Ce pouvoir n'a donc pas augmenté, il paraît même en train de disparaître.

Extrait aqueux de la pulpe, opalescent, jaunâtre par transparence. Le pH est 6,9.

La liqueur de Nessler montre la présence de l'ammoniaque.

Dosage de l'azote ammoniacal et nitrique par la méthode de Dewarda.

Azote ammoniacal, en milligrammes	1,6
Azote nitrique, en milligrammes	5,6

Distillation en ajoutant de l'acide sulfurique : distillat sans odeur, neutre au tournesol, pH égal à celui de l'eau distillée du laboratoire, 6 gouttes réglementaires au compte-goutte.

Epreuve du pouvoir réducteur : négative.

Hydrolyse : le résidu de la distillation acide contient un dépôt floconneux. On concentre le liquide avec dépôt jusqu'à un petit volume, on étend d'eau,

on neutralise avec de la lessive goutte par goutte : virage intense au jaune orangé à l'alcalinisation. Méthode de Bertrand : réduction égale à milligramme 7,3 Cu pour toute la quantité de l'extrait.

Extrait aqueux du sable, opalescent, jaunâtre.

Le pH est 8,8.

Epreuve de Nessler : positive.

Dosage de l'azote, méthode de Dewarda.

Azote ammoniacal, en milligrammes	1,6
Azote nitrique	10,1

Distillation acide : aucune trace de produits volatils.

Epreuve du pouvoir réducteur : négative.

Hydrolyse : Résidu de la distillation acide concentré sur bain-marie jusqu'à un petit volume. Virage au jaune intense à l'alcalinisation. Méthode de Bertrand : réduction équivalente à milligramme : 14,6 Cu pour toute la quantité de l'extrait.

Le sable silicique lavé à l'eau chaude garde une teinte jaune. Séché à 100°, il perd 10 p. 100 à la calcination. Soumis à l'hydrolyse, il donne des traces de réduction. Le dosage Kjeldahl montre qu'il contient 0,6 p. 1.000 d'azote organique.

Le bilan de l'azote inorganique est donc en milligrammes :

Azote initial : 27,7.

Azote restant :

Ammoniacaal	3,2
Nitrique	15,7
Total	18,9

Soit azote consommé : 8,8 ou 2,2 p. 100 des fibres disparues.

II. Gr. Pl. Silico-gel. Rond : 1 gr. 49.

Nitrate de potasse : 0,200 ou azote : 27,7.

Séjour à l'étuve, à 30°, cinquante-trois jours.

Séparation des fibres, préparation des extraits, etc., les mêmes que ci-dessus.

Pulpe. — Fibres restant : 0,81, soit disparu : 0,38 ou 32 p. 100.

On dose l'azote organique dans la pulpe lavée à l'eau chaude jusqu'à disparition des réactions ammoniacale et nitrique, par la méthode Kjeldahl. La quantité totale est 6 milligr. 2, soit environ 0,8 p. 100.

Extrait aqueux. — Le pH de l'extrait de la pulpe est 7,0.

Le pH de l'extrait du sable est 8,6.

Dosage de l'azote ammoniacal et nitrique, dans les deux extraits réunis par la méthode de Dewarda.

Trouvé en milligrammes :

Azote ammoniacal	0,97
Azote nitrique	16,69
Total	17,66

Donc azote consommé : 10 milligrammes ou environ 2,5 p. 100 de la cellulose disparue.

Le sable recueilli sans perte a une teinte jaune. Lavé à l'eau chaude jusqu'à disparition de l'azote inorganique, il est soumis au dosage Kjeldahl. Trouvé en milligrammes : 2,44 Le bilan complet de l'azote se présente donc comme suit, en milligrammes :

Retrouvé :	Azote initial : 27,7.
Azote ammoniacal	0,97
Azote nitrique	16,60
Azote organique, pulpe	6,18
— sable	2,44
Total	26,28

Le déficit de 1 milligr. 42 tombe probablement sur l'azote organique du liquide, lequel n'a pas été dosé. En effet, la différence entre l'azote consommé (10 milligrammes) et le total de l'azote organique (8,62) qui est 1,38, lui est sensiblement égal.

Sur les plaques à chiffons, son action n'est pas très intense. En voici un exemple :

I. 1 gr. 55 de chiffons ayant séjourné sur la plaque seize jours à 30°. Enlevés, lavés avec de la soude chaude à 1 p. 100 et de l'eau, recueillis sur filtre taré, il reste 1 gr. 28, soit perte, 0 gr. 26 ou 17 p. 100.

Les chiffons lavés ne donnent plus la réaction de l'oxycellulose ; ils se comportent comme des chiffons neufs.

LES FUSEAUX VERTS. — *Isolement.* — L'un de ces microbes, qui pourrait porter le nom de *Cellfalcicula viridis*, est assez répandu dans le sol et en est facilement isolable au moyen de la culture spontanée, en choisissant une terre maigre, de préférence. Notre terre *témoin* nous le fournit constamment, et on le reconnaît à première vue par les zones vertes dont il entoure les grains de terre (pl. V, fig. 14).

Cette teinte verte, d'un beau vert gazon, est son caractère macroscopique infaillible dans nos conditions de culture (voir pl. V, carré 6). Elle est surtout intense au revers, du côté du gel, tandis qu'elle est beaucoup plus pâle de face. Enlevée du gel, la feuille ne paraît même guère colorée de face ; au revers elle ne l'est qu'un peu plus ; de sorte que c'est plutôt la couche du gel qui prend la teinte ; en effet, on voit le gel teinté vert non seulement sous la feuille, mais aussi autour de la feuille jusqu'à une distance de 1 à 2 millimètres de son pourtour. Si on enlève la feuille, un rond vert reste visible sur le gel.

En séchant le gel, on a un gravier légèrement verdâtre ; réduit en poudre, et traité avec de l'alcool et de l'éther, il ne se décolore pas. Du reste, la production de cette substance verte est si peu abondante, qu'on ne saurait songer à l'isoler pour l'étude. Pour quelle raison la coloration ne se développe que du côté de la feuille attenant au gel, il est difficile de le dire.

Un autre caractère macroscopique constant est que le papier envahi garde sa texture en apparence inchangée : on n'aperçoit ni gonflement, ni mucosité, ni désagrégation. Sur les cultures spontanées, les zones vertes, même entourées de tous côtés par d'autres zones couvertes de mucosités, gardent obstinément et on pourrait dire indéfiniment, avec leur teinte, ce caractère. Si on les voit devenir par places muqueuses ou diaphanes, en prenant alors une teinte vert jade (voir pl. V, carré 7), on peut en conclure qu'un autre microbe y est associé, dont on donnera dans la suite brièvement les caractères.

Ces caractères macroscopiques font croire que le microbe se différencie spontanément de ses commensaux et qu'il défend avec succès les fibres envahies par lui de leur invasion. C'est ce qui se confirme par l'étude microscopique des zones et des premiers repiquages (voir pl. VIII, n° 5). On y constate une homogénéité aussi complète qu'on pourrait le désirer et on n'a dès l'abord aucun doute sur sa qualité d'agent de la modification observée. Les repiquages sur le milieu type reprennent facilement, et on a l'occasion de voir développer ses qualités de *spreader* en couvrant rapidement toute la feuille de la teinte qui lui est caractéristique.

Morphologie. — Sous le microscope, il se présente sous forme d'un petit fuseau, long de $2\text{ }\mu$, épais au milieu d'environ $0,7$. Il se colore très intensément par la méthode décrite page 571, les extrémités plus faiblement que la partie moyenne où l'on distingue un rassemblement de la substance chromatique.

La forme que l'on trouve dans les cultures plus âgées est plutôt celle d'un ovale allongé à bouts arrondis, comme on en voit quelques-uns sur le coin gauche supérieur du photogramme n° 5. Il est à conclure que les fuseaux la prennent en vieillissant. On ne remarque aucun changement dans les

vieilles cultures, si ce n'est qu'une partie des cellules ne se colorent que très faiblement, sans montrer pourtant de symptômes d'autolyse.

Motilité. — Le microbe est muni d'un cil, et la motilité qu'on observe en examinant une suspension sur fond noir est des plus intenses.

Culture. — C'est le milieu type qui est son milieu de prédisposition. La rapidité de sa propagation est un peu moindre que chez les vibrions décrits. Tout de même, les stries fines que l'on tire sur un rond de 150 millimètres atteignent une largeur de 1 centimètre au bout de quarante-huit heures à 30°. Au bout de trois jours, le rond est entièrement vert. La teinte s'accentue dans la suite, mais on ne constate aucune autre modification dans la texture du papier, en gardant la plaque de longues semaines à l'étuve.

Ensemencé sur la gélose à hydrocellulose, il y produit des taches vertes. Mais en traçant des stries fines au moyen d'un fil de platine trempé dans une suspension très étendue, on réussit à voir paraître sur le milieu des chapelets de colonies séparées, ce que l'on ne parvenait pas à obtenir dans les cas précédents. Ces colonies minuscules, atteignant à peine 1/2 millimètre, composées d'un mucus hyalin *vert jaunâtre*, peuvent être repiquées sans difficulté sur le même milieu en tubes inclinés. Une strie verte très caractéristique s'y forme, et on a ainsi des cultures pures qui se conservent assez longtemps. La teinte pénètre lentement dans la couche blanche du milieu, dont parfois toute la masse devient verte au bout de plusieurs semaines.

Quant aux tentatives de faire pulluler le microbe sur les quatre milieux gélosés — aux dépens de la peptone, du glucose, de l'amidon, de la gomme —, faites à deux reprises, elles ont donné un résultat négatif. Les quelques formes qu'on a isolées au moyen de ces milieux se sont montrées étrangères au microbe. Ensemencées sur silico-gel-papier elles n'ont pas provoqué la teinte caractéristique.

Action sur la cellolose. — A l'analyse des cultures, on ne trouve aucun caractère bien distinctif. L'action paraît nettement plus faible que chez les espèces précédentes, à en juger par les quantités détruites au bout d'un temps donné. Comme

exemple typique, voici l'analyse d'une plaque gardée pendant deux mois à 30°.

Rond papier, en grammes	1,19
Nitrate de potasse, en grammes	0,200
pH de la solution de sels	7,2

Plaque ensemencée en stries le 17 décembre.

Sortie de l'étuve le 17 février.

La feuille de papier ne se laisse pas enlever avec de l'eau. On doit avoir recours à un autre procédé : on en enlève, autant que faire se peut; on sèche ensuite le gel avec le reste des fibres qui y adhèrent; le gel réduit à des écailles vertes très dures est soumis à un lavage méthodique dans un bocal; en agitant au moyen d'une baguette, on décante la suspension des flocons qui se détachent jusqu'à ce que le liquide surnageant en soit parfaitement libre. On recueille, enfin, sur un seul filtre taré toutes les portions des fibres enlevées.

Ce reste — épuisé avec de l'eau froide seulement — pèse 0 gr. 90. La perte est donc environ de 25 p. 100.

La pulpe garde une teinte légèrement verdâtre. L'épreuve de la réduction est négative : le chiffre cuprique est à zéro.

Au chauffage à l'ébullition dans de la soude à 1 p. 100, elle lui communique une teinte jaune d'or.

Chauffée dans de la soude à 1 p. 100 à l'autoclave à 120° une demi-heure, elle perd 26 p. 100.

Extraits aqueux de la pulpe et du gravier silicique : 1.000 cent. cubes. Le pH est 6,8.

L'épreuve de la réduction avec 200 cent. cubes, concentrés au bain-marie jusqu'à 50 cent. cubes est négative.

On ajoute à 200 cent. cubes 5 cent. cubes d'acide sulfurique concentré et on distille en faisant passer 150 cent. cubes du liquide. Ce distillat ne diffère en rien de l'eau distillée.

Le résidu acide dépose un fin précipité floconneux. Soumis avec le dépôt à l'épreuve de réduction, il n'en donne aucune trace.

Le dosage de l'azote donne un total de 17 milligr. 4, dont 0,6 d'azote ammoniacal.

On dose encore 1 milligramme d'azote dans le sable silicique qui a été imparfaitement épuisé. Donc azote restant 18 milligr. 4.

Assimilé : 9 milligr. 3, ou environ 3 p. 100 des fibres disparues.

Comme le montre l'expérience, l'action du microbe n'est ni profonde, ni durable, car elle s'arrête en laissant la majeure partie de la cellulose fibreuse intacte. Il est facile de s'en convaincre au moyen de la méthode des chiffons : les chiffons verdis, lavés dans de la soude chaude à 1 p. 100 redeviennent blanc pur et se comportent exactement comme les chiffons neufs. Leur texture paraît peu raréfiée.

Ce microbe est donc un agent destructeur de la cellulose peu

puissant. Sa fonction consiste plutôt à envahir les fibres et à les soumettre à un certain degré d'oxydation. Cette fonction remplie, l'action s'arrête ; à d'autres de la reprendre.

En effet, on a vu qu'une feuille de papier de 15 centimètres de diamètre est verdie au bout de trois jours ; et il est facile de s'assurer, au moyen de l'examen microscopique, que ce verdissement correspond à un envahissement des fibres par le microbe ; que la feuille verdie est déjà oxydée, l'épreuve du colorant basique le démontre d'une manière décisive. Comparée à cette activité, la disparition de 0 gr. 3 de fibre d'une feuille d'un poids de 1 gr. 2 au bout de deux mois apparaît comme un exploit bien modeste et laisse conclure que ce n'est pas la destruction, mais l'oxydation rapide de la cellulose qui est la fonction principale du microbe.

Sous ce rapport, on trouve des analogies avec les *Cellvibrions*, mais dans ce cas le caractère est plus en relief.

LE FUSEAU VERT JADE. — Cette forme a été maintenue en culture plus de dix mois, mais ses caractères ne se sont pas précisés suffisamment, ce qui nous empêche encore de la considérer comme une espèce autonome. Cependant on ne manquera pas de la rencontrer sur des milieux cellulosiques et de la trouver différente de celles que nous venons de décrire. Il est donc utile de la différencier et d'en présenter une caractéristique qui sera des plus brèves.

La teinte que le microbe communique au papier est vert bleuâtre ou vert jade ; le papier se couvre immédiatement d'un mucilage abondant ; avec le temps, la couche devient diaphane — il y a donc fibrolyse — et le papier se transforme en un gel d'une belle teinte vert jade (voir pl. V, carré 7). Ces caractères macroscopiques le différencient nettement de l'espèce précédente. Il y a eu pourtant quelques fluctuations dans ces phénomènes, qui ont éveillé quelque doute ; ne se trouve-t-on pas dans ce cas en présence d'une action combinée ?

Le tableau microscopique du peuplement est pourtant bien homogène. Il présente des fuseaux allongés, longs de 2-3 μ , rappelant beaucoup ceux de l'espèce précédente, mais d'une taille un peu plus forte (voir pl. VIII, n° 8). Entremêlés à ces fuseaux on trouve souvent des filaments assez longs du même diamètre.

que les fuseaux et même souvent composés de chapelets de ces mêmes fuseaux; il est donc difficile de douter que ces végétations appartiennent à une seule et même espèce.

Il arrive parfois que le papier soit envahi par les deux espèces de fuseaux; on y distingue alors deux espèces de zones vertes: l'une sèche, opaque, d'un vert gris, l'autre muqueuse, diaphane, d'un vert jade, et ces zones demeurent indéfiniment l'une à côté de l'autre sans se confondre, les microbes défendant chacun leur territoire.

LES FAUCILLES. — En partant des microbes étudiés avec quelques détails, nous arrivons pour terminer notre revue à des formes, dont nous n'avons pas encore eu le loisir de pousser l'étude. Cependant, ces formes sont si caractéristiques pour le milieu étudié, que notre *vue d'ensemble* serait restée trop incomplète si l'attention n'était pas attirée sur elles.

Leur forme, assez rare en bactériologie, est celle d'un fuseau arqué en faucille ou quart de lune. Les photographies pl. VII, nos 3 et 6, en donnent une idée bien nette. Un grain chromatique remplit le milieu élargi de la cellule, tandis que ses *cornes* ne prennent qu'une coloration beaucoup plus pâle. Ceci est un caractère constant pour les pullulations jeunes. Avec l'âge, il n'est pas si marqué. Dans les vieilles cultures, les individus paraissent aussi moins arqués, un peu gonflés, avec des extrémités plus arrondies.

Nous en avons isolé et maintenu en culture pendant plusieurs mois deux espèces ou souches.

La forme minuscule que l'on voit sur le photogramme n° 3 et que l'on pourrait appeler *Cellulicula mucosa*, produit sur le papier presque la même teinte que le vibrion crème; elle est seulement un peu plus claire (pl. V, carré 1) et ne s'accentue pas avec l'âge. Ce qui la différencie, c'est la production assez abondante de mucilage, qui manque totalement dans le cas précédent. Ces caractères macroscopiques, joints à la forme caractéristique et rare, rendront le diagnostic du microbe facile. Ajoutons que le peuplement des jeunes cultures, examiné sur fond noir, fait montre d'une motilité des plus intense. On a cultivé le microbe sur la gélose hydrocellulosée, où il se développe abondamment, en rendant la surface chagrinée et en

communiquant à la couche blanche de gélose un ton grisâtre. Les tentatives de le faire pulluler sur d'autres milieux ont échoué. Les quelques formes étrangères que l'on a isolées au moyen de la gélose peptonée de ses cultures en différaient nettement et étaient sans action sur les fibres.

L'espèce plus forte que l'on voit sur le photogramme pl. VIII, n° 6 et que l'on pourrait appeler *Cellfalcicula fusca* a été isolée d'un tas de vieille sciure humifiée. Sur le milieu type, elle produit des taches brunâtres ou café au lait (voir pl. V, carré 5), non homogènes, mais un peu marbrées ou veinées. Avec l'âge, le papier, sans se couvrir de mucilage, se transforme en une pellicule partiellement transparente, sèche et très adhérente au gel.

Les articles sont longs de 1,2 à 2,5 μ , d'une épaisseur un peu au-dessus de 0,5 μ , très intensément colorables à l'état jeune, surtout le grain chromatique central. Ils recouvrent les fibres par leurs masses zoogéliques sans ordre apparent. Les phénomènes d'autolyse dans les cultures âgées sont bien marqués; ils marchent de manière que les articles commencent à ne plus prendre le colorant, perdent leur contours précis et se réduisent à des « ombres » bleuâtres, mais sans former de coccoïdes et tout en gardant à peu près leur forme. Ces « ombres » paraissent se disloquer en ne laissant pas de granules; se touchant, elles s'agglutinent en formant dans les préparations un fond continu, pâle, piqué çà et là d'individus ayant conservé leur forme et leur colorabilité.

Son rendement comme destructeur des fibres est notable. Dans une expérience qui a duré plusieurs semaines, un filtre d'un poids initial de 1 gr. 23 se présentait comme une pellicule sèche brunâtre, englobant des débris de fibres et entrecoupée d'ilots de papier raréfié bruni. Enlevé de la surface du gel au moyen d'un peu d'eau froide, en s'aidant avec une spatule, lavé et séché, ce reste pesait 0 gr. 45, soit disparu : 0 gr. 77 ou 63 p. 100. Ce reste chauffé à l'autoclave une demi-heure à 120° dans la soude à 2 p. 100 a perdu 33 p. 100 de son poids; il n'était donc composé qu'en partie de cellulose.

L'extrait aqueux de la pulpe, louche, ayant les caractères d'une suspension colloïdale, donne un précipité floconneux à l'acidification. Soumis à la distillation avec de l'acide sulfurique,

il ne donne aucun produit volatil. De même l'extrait du sable.

Aucun des deux ne réduit le Fehling. Par contre, après hydrolyse par ébullition avec de l'acide sulfurique, les deux manifestaient un pouvoir réducteur non douteux, dont on n'a pas dosé le produit.

LES CHAMPIGNONS. — L'ingérence des champignons est un fait courant lorsqu'on travaille d'après les méthodes décrites. Sans y insister dans ce mémoire, il est difficile de ne pas y toucher par quelques brèves remarques.

Dans les cultures spontanées, environ 10 à 20 p. 100 des grains sont entourés par des zones noires ou brunes d'un contour irrégulier, comme échevelé, qui sont des végétations mycéliennes (voir pl. V, fig. 14). L'examen microscopique y révèle des filaments mycéliens couchés le long des fibres ou les enfilant à travers leur canal, avec production de nombreuses anastomoses. Le repiquage de ces zones mycéliennes n'est pas aussi infaillible que celui des zones bactériennes. Souvent ce n'est qu'une pullulation bactérienne qui en est la suite, tandis que le champignon n'apparaît que bien plus tard ou point du tout.

Quand ces végétations reprennent, il est facile de les distinguer des pullulations bactériennes bien avant qu'elles se couvrent d'un duvet conidiophage, — ce qui n'arrive pas toujours, — d'après leur manière de s'étendre sur le papier, qui n'est pas continue comme celle des bactéries, mais prend la forme de taches entourées de protubérances variées. On n'y a jamais constaté de production de mucus.

Particulièrement caractéristiques sont les taches reproduites d'après nature sur la figure 22, pl. V. Dans ce cas, il y avait un mélange d'un vibrion, qui provoque la coloration jaune, avec un champignon qui dessine sur le papier des hachures grises et noires, ayant l'air d'avoir été crayonnées au hasard sur la feuille. La lignée repiquée de cette culture a donné des résultats assez instables. On constatait toujours ce développement double, où tantôt le vibrion dominait en défendant avec succès son territoire jaune, tantôt le mycélium le couvrait plus ou moins par sa teinte noire (voir fig. 17). Il y a eu finalement des cas où le papier est devenu peu à peu entièrement noir, sans laisser voir aucune tache plus claire (même pl., fig. 15.)

La teinte noire n'est pas la seule qui est produite par les champignons. On trouve des teintes brun-olivâtre, rosâtres, violettes. On a maintenu pendant plusieurs mois en culture une lignée qui se caractérisait par un coloris d'un violet sale (voir pl. V, fig. 8) qui s'étendait « en nuages » sur le papier, et où un mycélium jouait un rôle. Mais la teinte noire produite aux dépens de la cellulose est particulièrement intéressante par rapport à la question de l'humification, sur laquelle on reviendra tout à l'heure.

DISCUSSION DES RÉSULTATS. CONCLUSIONS.

D'accord avec la tendance, qui s'accentue de plus en plus en Bactériologie, de grouper les espèces d'après leurs fonctions et habitats (⁴) — mode de groupement décidément le plus pratique, — on ferait de ces organismes, malgré la diversité de leur forme, une tribu à part. On trouve, du reste, déjà, dans le Manuel cité, un genre *Cellulomonas* avec une trentaine d'espèces formant une tribu caractérisée par « la propriété de digérer la cellulose ». Mais ce sont les espèces isolées par Kellerman et ses collaborateurs, qui ont été douées à tort, comme nous l'avons démontré, de cette propriété. Elles devraient donc céder leur place dans le système aux microbes que nous venons de décrire, dont la fonction ne peut être mise en doute.

Aux deux genres ou groupes d'agents bactériens que nous avons établis au début de nos recherches, nous croyons devoir en ajouter un troisième, et voici le groupement que nous proposons et les caractéristiques qui résument nos observations.

GENRE CYTOPHAGA. — *Morphologie* : filaments longs 3 à 8 μ , grêles, acuminés, flexueux, rarement spiralés, présentant une condensation de matière chromatique dans la partie moyenne du filament.

Motilité probable, mais inconnue.

Autolyse : au vieillissement, autolyse générale conduisant à la formation de coccoïdes qui disparaissent lentement par gonflement.

⁴. Voir : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baltimore, 1923.

Reproduction probable par petits fragments des filaments (arthrospores) qui échappent à l'autolyse générale.

Fonction strictement spécifique. Incapacité d'utiliser, comme source de carbone et d'énergie, les matières alimentaires autres que la cellulose. Au delà d'une dose minime, effet entravant, antiseptique de ces matières en présence de la cellulose. Pullulations exclusivement en contact immédiat avec les fibres, formant revêtement qui s'y ineruste en s'adaptant à leur structure.

Action oxydante et fibrolytique; transformation intégrale de la matière fibreuse en un gel de nature acide.

Caractères de culture sur silico-gel-papier : taches vivement colorées en jaune-l'œuf, orange, rose, rouge-brique, etc. Sous ces taches le papier devient diaphane.

Observé quatre espèces ainsi désignées : Cytophaga Hutchinsoni, C. aurantiaca, C. rubra, C. tenuissima, qui se distinguent par la taille des filaments, la teinte de leurs colonies sur le milieu type et la rapidité de la fibrolyse.

GENRE CELLVIBRIO. — *Morphologie : bâtonnets longs 2 à 5 μ , grêles, à bouts arrondis, parfois un peu plus épais au milieu, arqués, rarement en tour de spirale.*

Motilité : extrêmement intense. Munis d'un cil unique.

Autolyse : bien marquée chez l'une des espèces avec formation de coccoïdes; moins chez les autres.

Reproduction par fragmentation (arthrospores).

Fonction non invariablement spécifique; mais on n'a trouvé qu'une seule espèce omnivore.

Action oxydante, avec production d'une substance qui confère aux fibres les propriétés de l'oxycellulose.

Pas de fibrolyse, ou rarement et tardivement.

Caractères de culture : sur silico-gel-papier, taches jaunes, allant d'une teinte crème jusqu'à une teinte ocre, diffuses, s'étendant avec une grande rapidité. Sur gélose hydrocellulosée, pas de colonies distinctes, pénétration de la masse entière de la gélose, en lui conférant les mêmes teintes. Sur gélose peptonée, amidonnée, glucosée, gommée, pullulation de l'espèce C. flavesiens (vibron crème), seule, sous forme de colonies hyalines minuscules.

Les espèces paraissent nombreuses.

Deux étudiées : C. ochracea, C. flavesiens.

Restent les formes minuscules en fuseau droit, ou courbées en faucille, dont la forme ne permettrait pas l'incorporation dans le genre précédent, quoiqu'elles s'en rapprochent par leur fonction. On pourrait les réunir en un troisième genre, appelé *Cellfalcicula*.

GENRE CELLFALCICULA. — *Morphologie* : formes en fuseau ou faucille d'une longueur n'excédant pas 2 μ , à bouts pointus; grain chromatique dans la partie moyenne du fuseau.

Motilité très intense, cil unique.

Autolyse peu marquée. Pas de coccoïdes.

Fonction : paraît spécifique. Pas de pullulations constatées aux dépens de substances autres que la cellulose.

Action oxydante avec production d'oxycellulose. Fibrolyse absente, ou rare et tardive.

Caractères de culture. Sur silico-gel-papier : taches vertes, ou autre teinte (crème, café au lait), mais non franchement jaune, ni orange, ni rouge. Sur gélose hydrocellulosique : coloration diffuse, rarement formation à la surface de minuscules colonies hyalines (vertes dans le cas du fuseau vert). Espèces probablement nombreuses. Trois différenciées : *Cellfalcicula viridis*, *C. mucosa*, *C. fusca*.

Aux résultats morphologiques de ce mémoire il y a lieu d'en ajouter encore un d'ordre négatif, à savoir :

On ne trouve aucun bacille sporogène parmi les agents de la dégradation aérobiose de la cellulose.

C'est un nouveau fait à l'appui de notre opinion, émise ailleurs, que les bacilles sporogènes ne jouent qu'un rôle bien effacé dans le sol arable à l'état normal. La dégradation aréobie de la cellulose y a lieu entièrement en dehors de leur activité.

Il n'échappera à personne que la morphologie de ces microbes présente quelques analogies avec celle de nombre d'autres microbes fusiformes, spiralés ou non, que l'on a découverts dans des milieux bien différents. A l'aspect d'une préparation présentant des champs couverts de bactéries fusiformes, droites, sinuées ou spiralées, on pourrait être tenté de parler d'associations *fuso-spirochétienne* ou de *Héliconèmes*, d'après le

mémoire suggestif de Sanarelli (¹). Les analogies sont pourtant encore assez éloignées, en somme, pour y insister; du reste, le caractère bien spécial des microbes de la cellulose, par rapport surtout à leurs fonction et habitat, n'encouragerait pas les rapprochements.

Il importe cependant de relever l'identité absolue des corps coccoïdes des spirochètes — dont tant d'auteurs se sont occupés et au sujet desquels les opinions sont si divisées — avec les coccoïdes des *Cytophaga*. La description si exacte de Sanarelli concernant « ces corps globuleux ou sphéroïdes qui n'ont pas l'aspect de coccus, mais qui ressemblent à de petits amas sphériques de protoplasma raréfié, de dimensions très variables, très résistants à la pénétration des substances colorantes » (à lire : dépourvus de substance chromatique), ainsi que ses photogrammes très nets, qui figurent leur aspect, ne laissent pas le moindre doute sur ce sujet.

Comme on l'a vu, nous avons pris position dans la question controversée en niant tout rôle physiologique à ces corpuscules et en les envisageant comme des états d'autolyse, dont l'issue n'est que la désorganisation et la mort. Certes, on en a déjà observé, de ces états d'autolyse, chez plusieurs espèces bactériennes, dus à telle ou telle influence, mais le cas des *Cytophaga* est particulièrement frappant; ici l'autolyse générale est l'aboutissement régulier de toute pullulation de ces microbes ayant lieu dans leurs conditions de prédilection, bien simples, et de plus *les seules qui rendent leur existence possible*. Et voici, que l'on constate qu'*aussitôt sa fonction remplie, l'agent meurt et se désorganise à son tour et son azote — et, en général, la matière qu'il a assimilée — se disperse sans tarder, en se mêlant au produit même de son action*.

Sans pouvoir suivre ici tous les développements que comporte le fait, nous nous bornons à signaler son importance pour la compréhension de l'origine et des propriétés de la substance organique du sol. On sait que l'origine et la nature de cette substance est un sujet de controverses qui durent depuis plus d'un siècle et qui sont encore loin d'aboutir à un accord. Nous nous garderons bien d'évoquer tout le problème vers la fin d'un

1. Ces *Annales*, 41 pp. 679-721, 1927.

mémoire qui dépasse déjà de beaucoup le volume coutumier. Il nous suffira de rappeler les caractères de cette substance, désignée souvent sous le nom d'*humus*, pour poser ensuite la question de savoir si une substance qui y répond est produite aux dépens de la cellulose par les bactéries aérobies décrites. Les caractères que l'on est universellement d'accord à attribuer à ce colloïde organique comportent : 1^o sa solubilité dans les alcalis étendus, 2^o sa précipitation par les acides, 3^o sa dispersibilité dans l'eau, 4^o sa teneur en azote organique variant autour de 2 p. 100, 5^o sa résistance à l'action microbienne, 6^o enfin, sa couleur brune ou noire.

Eh bien, après avoir pris connaissance des données du présent travail, il est impossible de ne pas voir, que le *produit de l'action de nos bactéries, particulièrement le colloïde préparé si abondamment par les Cytophaga, mais aussi la matière oxycellulosique des autres, y répondent parfaitement, moins la couleur sombre*. Or, cette teinte a été considérée toujours comme une qualification essentielle de la substance organique du sol, à tel point que cela pourrait paraître comme une sorte de contradiction dans l'adjectif, de parler d'un humus à teinte claire. Et pourtant, à la suite de nos études, des doutes nous paraissent autorisés sur la valeur de ce caractère, qui n'est que celui d'un mélange extrait du sol, et où les colloïdes clairs peuvent bien être masqués par une substance noire, tout comme une trace d'encre de Chine pourrait noircir une quantité considérable de substance non colorée. D'après les données de Sven Oden, qui a élaboré une méthode colorimétrique pour le dosage des matières humiques (1), 0 gr. 01 d'acide humique sous forme d'humate alcalin suffit pour communiquer une teinte brune à un litre de liquide, lequel devient brun noir et opaque aussitôt que l'on dépasse cette dose.

On ne saurait donc nier la possibilité, que le colloïde du sol ne soit composé qu'en partie d'une substance brune ou noire, le reste, probablement même le gros de ce colloïde, possédant des teintes claires.

La matière humique est-elle produite aux dépens de la cellulose? c'est une question, dont la discussion ne cesse pas

(1) Die Huminsäuren. *Kolloidchemische Beihefte*, 41, 1919, p. 75-261.

depuis bien longtemps. Depuis Hoppe-Seyler, qui y répondait négativement, ne voyant pas se former de produits noirs à la suite de la fermentation anaérobiose du papier, jusqu'à Waksman (1), qui affirme à la suite de ses expériences de décomposition des fibres dans la terre, que la cellulose subit dans le sol une destruction complète, en n'y laissant que la matière des organismes qui y ont pullulé à ses dépens, — toutes les nuances des opinions *pour* et *contre* sont représentées dans cette discussion. Malgré l'intérêt que présentent des recherches purement chimiques sur la matière humique extraite du sol, ainsi que les expériences biochimiques ou agrochimiques dans le genre de celles de Waksman, il paraît bien douteux que l'on puisse jamais arriver à des conclusions suffisamment claires sur l'origine et la nature du colloïde organique du sol dans ces directions. Les conditions y sont trop complexes et les résultats trop sujets à des interprétations incertaines. A notre avis, il n'est possible de venir à bout des difficultés inhérentes aux problèmes posés qu'en se tenant au principe d'étudier l'effet d'un agent microbien déterminé sur une substance déterminée dans les conditions les plus simples s'approchant autant que possible des conditions naturelles.

A ce principe on a été fidèle dans ces recherches, et c'est lui qu'on recommande pour les études sur le sort des substances qui composent le squelette végétal dans le sol. C'est grâce à lui que l'on a pu distinguer, en laissant de côté toute une gamme de caractères secondaires qui diversifient l'activité des agents différents, essentiellement deux processus : 1^o *La transformation de la cellulose en un colloïde de nature acide contenant de l'azote organique et inattaquable pour les microbes banaux*; 2^o *L'oxydation extrêmement rapide de la cellulose qui se charge d'oxycellulose et acquiert des propriétés acides*.

Les deux phénomènes se produisent-ils de la même manière dans le sol que sur nos plaques? On ne trouve aucune raison de se refuser à l'admettre, les conditions des expériences imitant d'assez près celles du milieu naturel, même jusqu'à la non-exclusion des commensaux. Si c'est ainsi, on est conduit à attribuer

(1) The origin and the nature of the soil organic matter or soil « Humus ». Cinq mémoires. *Soil Science*, vol. XXII, 1926.

buer à ces microbes le rôle des plus importants de producteurs de colloïde organique dans le sol, et il est à croire que c'est là l'une de ses sources les plus abondantes.

Une troisième question, encore ouverte, touche à la part que prennent les microbes autres que les bactéries à la décomposition aérobique de la cellulose. C'est Waksman qui lui a consacré des études suivies, déjà citées; elles ne l'on conduit définitivement qu'à la conclusion que les deux familles, champignons autant que bactéries, y prennent une part très active et que ce ne sont que des conditions secondaires — degré d'humidité, réaction etc. — qui font pencher la balance vers l'un ou l'autre côté. Sans contester que les conditions invoquées peuvent exercer un certain effet sur l'activité de ces deux groupes, ce n'est pas seulement la quantité de la cellulose décomposée (seule expression courante), mais *surtout la qualité de l'action qui attire l'attention.*

On y constate, notamment, des différences bien profondes. Ainsi, 1^o les champignons (dont on a suivi tant de cultures sur plaques à papier durant ces trois dernières années!) n'exercent pas un effet fibrolytique bien marqué, ils ne produisent point de gel; ils ne sont donc pas producteurs de colloïde organique, ce qui reste une spécialité des bactéries; 2^o il ne peut y avoir aucune comparaison entre les deux groupes par rapport à la rapidité d'envahissement des couches fibreuses; la différence est telle, en tenant compte des faits rapportés sur les Cellvibrions, que l'on devrait en conclure que les champignons n'arrivent jamais dans le sol à attaquer les fibres saines, mais seulement à continuer, en quelque sorte, l'action des vibrions sur de la matière oxydée, déjà acidifiée.

A ces deux différences d'ordre négatif se joint une troisième, qui est positive et qui touche à une activité bien intéressante des champignons : c'est celle de produire une *humification noire* (que l'expression soit permise!) des fibres. L'action paraît bien spéciale aux champignons, autant qu'il a été possible d'en juger à la suite d'études encore incomplètes. Ce n'est pas seulement les taches noires sur papier et tissu qui autorisent cette conclusion, car la coloration pourrait provenir des filaments à membrane brune, mais l'examen microscopique des fibres, dont la désorganisation est très lente dans ce cas :

on les voit prendre une teinte enfumée, bien différente de celle des filaments, et se transformer en une couche de plus en plus brune ou noire, qui reste indéfiniment dans cet état sans se raréfier, ni disparaître avec le temps.

Ce phénomène d'humification d'origine mycélienne est à l'étude.

Restent à résumer les principaux caractères chimiques du processus de la dégradation de la cellulose fibreuse, autant que les méthodes d'analyse employées ont permis de le saisir.

1^o *La cellulose fibreuse subit une oxydation rapide, à la suite de laquelle elle se charge d'un produit donnant les réactions de l'oxycellulose;*

2^o *Cette substance, dispersible dans l'eau, soluble dans les alcalis faibles, précipitable par les acides, est extractible des fibres oxydées en laissant de la cellulose inchangée;*

3^o *Les fibres oxydées, ni l'oxycellulose extraite des fibres ne possèdent aucun pouvoir réducteur. Ce caractère négatif marque une différence essentielle entre l'oxydation biologique et l'oxydation chimique;*

4^o *L'extrait des fibres oxydées, qui présente les caractères d'une suspension colloïdale, soumis à l'hydrolyse par ébullition avec des acides forts, manifeste parfois un pouvoir réducteur dosable dans la liqueur de Fehling bouillante. Plus souvent, l'hydrolyse ne conduit pas à ce pouvoir;*

5^o *Le processus ne marche qu'en présence de l'azote assimilable, inorganique de préférence, qui passe à l'état d'azote organique au taux d'environ 2 p. 100 de la cellulose disparue;*

6^o *L'azote nitrique subit une réduction partielle en passant à l'état d'azote ammoniacal, malgré l'accès d'air illimité. On en trouve des quantités faibles, mais dosables, dans les cultures qui n'ont pas épuisé leur réserve en azote nitrique;*

7^o *La marche des cultures n'est régulière et durable qu'à condition d'un pH initial au-dessus de 7,0. Le pH tend à changer durant le processus, principalement à la suite de l'assimilation des ions azotés, soit, dans le sens de l'alcalinité en présence des nitrates alcalins, de l'acidité, en présence de sels ammoniacaux. Le colloïde acide formé exerce sur la réaction une influence faible, mais perceptible;*

8^e Il n'y a production d'aucun acide gras, ni généralement d'aucun produit volatil. Le fait est tellement régulier et constant que la présence de ces produits est à envisager comme un indice de l'ingérence des microbes anaérobies.

LÉGENDES DES PLANCHES

PLANCHE V

(La reproduction chromolithographique n'a réussi à reproduire les teintes réelles que d'une manière approximative.)

FIG. 1-12. — Teintes produites sur le papier par les différentes espèces bactériennes décrites dans le mémoire. Voir texte.
 FIG. 13. — Deux genres de zones vertes produites sur le papier par les *Fuseaux verts*.
 FIG. 14. — Culture spontanée sur plaque silico-gel-papier.
 FIG. 15. — Papier noirci par le mycélium noir.
 FIG. 16 et 18. — Repiquage sur papier, points et stries, de *Cytophaga orange*.
 FIG. 17. — Zone mélangée : noire mycélium, jaune vibrion.
 FIG. 19. — Stries diffuses de *Cytophaga rouge brique*.
 FIG. 20. — Deux zones bactériennes nettement délimitées à la suite d'un repiquage.
 FIG. 21. — Colonie de *Cytophaga orange* entourée d'une zone jaune, vibrionniene.
 FIG. 22. — Rond de papier sur silico-gel recouvert de végétations jaunes et noires : mélange vibrion-mycélium.
 FIG. 23. — Papier ensemencé en stries avec la *Cytophaga jaune*, gardé quelques jours sur plaque silico-gel à l'étuve, enlevé et soumis à l'épreuve du bain de bleu de méthylène.
 FIG. 24. — Mucus jaune de la *Cytophaga jaune* en stries bombées, sur papier.
 FIG. 25. — Le carré de papier de la figure 23 vu du revers.

PLANCHE VI

(Clichés de M. Jeantet. Grossissement 1850.)

N^o 1. — *Cytophaga Hutchinsoni*. Revêtement d'une fibre.
 N^o 2. — *Cytophaga aurantiaca*. Lambeau de revêtement. Préparation prise dans la zone orange d'une culture spontanée.
 N^o 3. — Même organisme. Revêtement après fibrolyse presque complète.
 N^o 4. — Même organisme. Filaments rangés sur une fibre.

PLANCHE VII

(Clichés de M. Jeantet. Grossissement 1850.)

N^o 1. — *Cytophaga Hutchinsoni*. Jeune culture. Les filaments commencent à envahir les fibres.
 N^o 2. — Association *Cytophaga-Coccus* sur une fibre désorganisée.
 N^o 3. — *Cytophaga aurantiaca*. Jeune culture. Les filaments commencent à s'incruster sur les fibres.

N° 4. — *Cytophaga tenuissima* sur fibres.
N° 5. — *Cytophaga lutea*. Préparation prise dans une zone jaune d'une culture spontanée.
N° 6. — *Cytophaga aurantiaca*. Vieille culture : coccoïde, reste des filaments, granules.
N° 7. — *Coccus* à pullulation strepto-staphylococcique, associé aux *Cytophaga*.
N° 8. — *Cytophaga Hutchinsoni*. Vieille culture. État identique au n° 6.

PLANCHE VIII

(Clichés de M. Jeantet. Grossissement 1850.)

N° 1. — *Cellvibrio ochracea*. Culture jeune sur silico-gel-papier.
N° 2. — Souche du même genre sur le même milieu.
N° 3. — *Cellfalcicula mucosa*. Culture spontanée.
N° 4. — *Cellvibrio ochracea*. Cils.
N° 5. — *Cellfalcicula viridis*. Culture jeune sur silico-gel-papier.
N° 6. — *Cellfalcicula fusca*.
N° 7. — *Cellvibrio flavescent* (le vibron crème). Jeune culture sur silico-gel-papier.
N° 8. — *Le fuseau vert jade*. Jeune culture composée de filaments et de bâtonnets fusiformes.
N° 9. — *Cellvibrio flavescens*. Culture âgée sur gélose glucosée : formes coccoïdes.
N° 10. — Même vibron sur gélose peptonée. Culture jeune.
N° 11. — Même vibron sur gélose peptonée. Culture âgée de trois mois.
N° 12. — Même vibron. Culture sur gélose glucosée. Autolyse complète.

**SUR LA VACCINATION DU COBAYE CONTRE LE TÉTANOS
PAR INJECTION INTRACÉRÉBRALE
D'ANATOXINE TÉTANIQUE**

par P. DESCOMBEY.

I

L'idée de réaliser l'immunisation antitétanique par la voie intracérébrale n'est pas nouvelle. Déjà, en 1907, Marie a tenté, sans succès toutefois, l'immunisation du lapin par injection de toxine tétanique dans le cerveau. Cet échec était inévitable ; il s'explique si l'on considère les difficultés qu'ont rencontrées tous les chercheurs qui ont tenté de vacciner contre le tétanos au moyen de toxine tétanique pure. Ces difficultés tiennent à ce fait que les quantités de toxine qui correspondent à des doses non pathogènes sont si réduites que leur pouvoir antigène est absolument nul.

L'anatoxine tétanique, antigène atoxique doué d'un pouvoir immunisant très élevé, devait nous permettre de réussir, là où nos devanciers avaient échoué.

C'est ainsi que nous avons pu, très aisément, réaliser l'immunisation antitétanique du cobaye (1) par injection directe d'anatoxine tétanique dans le cerveau.

**II. — TOLÉRANCE DU CERVEAU
VIS-A-VIS DES INJECTIONS D'ANATOXINE TÉTANIQUE.**

Cette tolérance est, en général, assez satisfaisante. Si, après trépanation du crâne suivant la technique courante, on injecte, avec les précautions d'usage, 0 c. c. 1 d'anatoxine dans un des hémisphères cérébraux, le cobaye ainsi injecté reste quelques

(1) On réalise, aussi aisément, l'immunisation antitétanique du lapin par la même voie.

instants dans un état de stupeur, le rythme respiratoire s'accélère, le corps entier est agité de tremblements. A cette période succède parfois une phase d'excitation : brusquement, le cobaye part comme une flèche, se heurte aux obstacles qu'il rencontre, et, sans chercher à les contourner, se dresse en bondissant contre eux comme pour les escalader, puis, il tombe sur le sol, épuisé. Au bout de quelques minutes il se relève ; tout est rentré dans l'ordre, il ne présentera plus, dès lors, aucun phénomène nerveux appréciable.

Si, au lieu de 0 c. c. 1, on injecte 0 c. c. 2, les phénomènes d'excitation sont quasi-constants et 50 % des animaux meurent dans l'heure qui suit l'injection.

III. — L'INJECTION INTRACÉRÉbraLE D'ANATOXINE VACCINE-T-ELLE LE COBAYE CONTRE LE TÉTANOS ?

Il est extrêmement facile de s'en rendre compte. Prenons deux lots de douze cobayes chacun ; injectons à chacun des cobayes du premier lot 0 c. c. 1 d'anatoxine sous la peau de l'abdomen, à chacun des cobayes du deuxième lot, une dose égale de la même anatoxine dans un des hémisphères cérébraux. Au bout de deux mois éprouvons tous ces cobayes de façon identique dans chaque lot, par injection intramusculaire de quantités variables de toxine tétanique, *quantités toujours mortelles pour des témoins*.

Nous voyons, dans les jours suivants, que ces cobayes témoignent d'une incontestable résistance à l'épreuve pourtant sévère à laquelle il sont soumis.

Voici les résultats de cette expérience ; l'injection d'épreuve a été faite le 15 octobre 1924.

1^o Vaccination sous-cutanée.

- Cobaye n° 37, 1 dose mortelle, pas de tétanos.
- Cobaye n° 91, 1 dose mortelle, pas de tétanos.
- Cobaye n° 70, 2 doses mortelles, tétanos local le 17, survit.
- Cobaye n° 32, 2 doses mortelles, pas de tétanos.
- Cobaye n° 19, 2 doses mortelles, tétanos local le 17, survit.
- Cobaye n° 45, 5 doses mortelles, tétanos local le 17, survit.
- Cobaye n° 41, 5 doses mortelles, pas de tétanos.
- Cobaye n° 83, 5 doses mortelles, pas de tétanos.
- Cobaye n° 3, 10 doses mortelles, pas de tétanos.

Cobaye n° 13, 10 doses mortelles, pas de tétanos.

Cobaye n° 90, 20 doses mortelles, tétanos local le 17, survit.

Cobaye n° 74, 20 doses mortelles, tétanos local le 17, survit.

2^e *Vaccination intracérébrale.*

Cobaye n° 93, 1 dose mortelle, pas de tétanos.

Cobaye n° 28, 1 dose mortelle, pas de tétanos.

Cobaye n° 35, 2 doses mortelles, tétanos local le 17, survit.

Cobaye n° 55, 2 doses mortelles, pas de tétanos.

Cobaye n° 43, 5 doses mortelles, pas de tétanos.

Cobaye n° 1, 5 doses mortelles, tétanos local le 17, survit.

Cobaye n° 47, 5 doses mortelles, pas de tétanos.

Cobaye n° 86, 5 doses mortelles, pas de tétanos.

Cobaye n° 26, 10 doses mortelles, pas de tétanos.

Cobaye n° 40, 10 doses mortelles, pas de tétanos.

Cobaye n° 22, 20 doses mortelles, tétanos local le 16, *mort le 17.*

Cobaye n° 24, 20 doses mortelles, tétanos local le 17, survit.

3^e *Témoins.*

Cobaye n° 48, 1 dose mortelle, tétanos local le 17, *mort le 20.*

Cobaye n° 32, 2 doses mortelles, tétanos local le 17, *mort le 19.*

Cobaye n° 7, 5 doses mortelles, tétanos local le 16, *mort le 18.*

Cobaye n° 22, 10 doses mortelles, tétanos local le 16, *mort le 17.*

Cobaye n° 26, 20 doses mortelles, tétanos local le 16, *mort le 17.*

Ainsi, quelle que soit la voie que l'on utilise, sous-cutanée ou intracérébrale, pour injecter l'anatoxine, la résistance conférée par une même dose d'antigène est toujours d'un ordre de grandeur équivalent. Nous considérerons donc comme acquis les deux points suivants :

1^e *L'injection intracérébrale d'anatoxine tétanique vaccine le cobaye contre le tétanos ;*

2^e *La résistance conférée au cobaye par cette injection est comparable à celle que détermine l'injection sous-cutanée d'une dose égale du même antigène.*

IV. — LE COBAYE ACTIVEMENT IMMUNISÉ CONTRE LE TÉTANOS RÉSISTE-T-IL A L'INJECTION INTRACÉRÉbraLE DE TOXINE TÉTANIQUE ?

La possibilité d'immuniser le cobaye par voie cérébrale étant établie, nous allons aborder la question de la sensibilité des centres nerveux du cobaye à la toxine tétanique. Rappelons ici ce fait, signalé par Binot dans sa thèse, que la sensibilité du cobaye à la toxine tétanique est fixe, entendons par là qu'il

faut toujours, pour faire périr dans un temps donné un cobaye neuf de poids donné, la même quantité de la même toxine, que celle-ci soit injectée dans les veines, dans les muscles, sous la peau ou dans les viscères. Nous avons vérifié l'exactitude de ce fait en ce qui concerne la voie cérébrale.

Le cobaye neuf n'est donc pas plus vulnérable par la voie intracérébrale que par la voie sous-cutanée.

Qu'advient-il si on injecte de la toxine tétanique dans le cerveau d'un cobaye vacciné soit par voie sous-cutanée, soit par voie intracérébrale ? L'expérimentation va nous renseigner sur ce point.

Le 12 juillet 1924, 6 cobayes de 350 grammes reçoivent dans un hémisphère cérébral 0 c. c. 1 d'anatoxine ; le même jour, 6 cobayes de poids égaux reçoivent une dose égale de la même anatoxine sous la peau de l'abdomen.

Le 18 août suivant tous ces cobayes sont éprouvés par injection intracérébrale de quantités variables de toxine tétanique, *quantités toujours mortelles pour des témoins*. Voici les résultats de cette expérience :

1^o *Vaccination intracérébrale.*

- Cobaye n° 23, 2 doses mortelles, pas de tétanos.
- Cobaye n° 21, 2 doses mortelles, tétanos le 23, mort le 24.
- Cobaye n° 61, 5 doses mortelles, pas de tétanos.
- Cobaye n° 35, 5 doses mortelles, pas de tétanos.
- Cobaye n° 41, 10 doses mortelles, tétanos le 23, survit.
- Cobaye n° 78, 20 doses mortelles, tétanos le 19, mort le 22.

2^o *Vaccination sous-cutanée.*

- Cobaye n° 43, 2 doses mortelles, pas de tétanos.
- Cobaye n° 45, 2 doses mortelles, tétanos le 22, survit.
- Cobaye n° 73, 5 doses mortelles, pas de tétanos.
- Cobaye n° 57, 5 doses mortelles, tétanos le 23, survit.
- Cobaye n° 65, 10 doses mortelles, pas de tétanos.
- Cobaye n° 67, 20 doses mortelles, tétanos le 19, mort le 20.

3^o *Témoins.*

- Cobaye n° 92, 1 dose mortelle, tétanos le 22, mort le 23.
- Cobaye n° 82, 2 doses mortelles, tétanos le 22, mort le 22.
- Cobaye n° 90, 5 doses mortelles, tétanos le 20, mort le 20.
- Cobaye n° 80, 10 doses mortelles, tétanos le 19, mort le 20.
- Cobaye n° 77, 20 doses mortelles, tétanos le 19, mort le 20.

La conclusion qui s'impose à la lecture de ces résultats, c'est

que l'injection intracérébrale d'anatoxine vaccine contre l'épreuve intracérébrale par la toxine, aussi bien que contre l'épreuve sous-cutanée, mais que l'injection sous-cutanée d'une dose égale du même antigène permet d'atteindre le même but dans des délais strictement égaux.

Il n'y a donc pas chez le cobaye vacciné de sensibilité particulière de l'encéphale à la toxine tétanique ; il n'y a pas non plus d'immunité locale, particulière de cet organe, puisque, d'une part, l'injection sous-cutanée d'anatoxine permet de mettre l'encéphale à l'abri des effets de l'injection directe de toxine, puisque, d'autre part, l'injection directe de l'antigène dans le cerveau ne confère pas à celui-ci une résistance plus marquée que l'injection sous-cutanée.

V. — A QUOI EST DUE, CHEZ LE COBAYE VACCINÉ, LA RÉSISTANCE DE L'ENCÉPHALE A L'INJECTION DIRECTE DE TOXINE.

Au cours de nos recherches sur l'immunité antitétanique, nous avons remarqué et signalé bien des fois que cette immunité est relative et qu'elle est toujours dans l'étroite dépendance des qualités antitoxiques des humeurs. L'existence de ces faits, les caractères de l'immunité obtenue par voie cérébrale chez le cobaye, nous permettaient de penser que cette immunité est de même ordre que celle que l'on peut obtenir par les voies habituelles, qu'elle est par conséquent d'ordre humorale. Pour vérifier le bien fondé de cette opinion, nous avons recherché systématiquement la présence de l'antitoxine dans les humeurs de nos cobayes vaccinés par voie cérébrale. Nous avons été ainsi amené à constater que la présence d'antitoxine tétanique est aussi régulière à la suite de l'injection intracérébrale qu'à la suite de l'injection sous-cutanée. L'activité des sérums obtenus est fort variable : ceux-ci ne neutralisent le plus souvent que des fractions de doses mortelles de toxine tétanique au centimètre cube, rarement quelques doses mortelles, très exceptionnellement plusieurs dizaines de doses mortelles.

Exemples : a) Sur 12 sérums provenant de cobayes vaccinés depuis un mois, 6 neutralisent parfaitement une dose mortelle, 5 une demi dose mortelle, le douzième ne neutralise pas même une demi dose mortelle ;

- b) Sur 5 sérum provenant de cobayes vaccinés depuis un mois, 1 neutralise parfaitement une dose mortelle, 2 une demi dose mortelle, les 2 autres ne neutralisent pas même une demi dose mortelle;
- c) Six cobayes ont fourni, deux mois après la vaccination, des sérum capables de neutraliser, à la dose de 0 c. c. 5 deux doses mortelles de toxine;
- d) Dix cobayes vaccinés depuis quatre-vingts jours ont fourni des sérum d'une activité relativement grande. Ils ont été éprouvés sur cinq doses mortelles de toxine ; 2 d'entre eux neutralisent cette dose d'épreuve à raison de 0 c. c. 01, 3 à raison de 0 c. c. 05, 2 à raison de 0 c. c. 1, les 3 autres n'ont pu la neutraliser à raison de 0 c. c. 5.

L'injection intracérébrale d'anatoxine est donc suivie de la production d'antitoxine. Cette production d'antitoxine est quantitativement très variable d'un sujet à un autre. Cette constatation est à rapprocher de ce fait que les cobayes vaccinés soit par voie intracérébrale, soit par voie sous-cutanée, témoignent d'une résistance très variable. Tel sujet résiste à 20 doses mortelles alors qu'un autre, préparé de façon strictement identique, succombe à l'injection de 1 ou de 2 doses mortelles seulement.

S'il est vrai, comme nous le pensons, que la résistance acquise à la suite de l'injection intracérébrale est de même ordre que celle que développe l'injection sous-cutanée, la résistance à l'épreuve intracérébrale devra être d'autant plus grande que le titre antitoxique des humeurs sera plus élevé et ce, quelle que soit la voie d'introduction de l'antigène. Pour obtenir un titre antitoxique humoral élevé, il suffit d'injecter de fortes doses d'antigène. La voie cérébrale nous est ici interdite, elle ne permet d'injecter que de faibles quantités d'antigène. Les animaux préparés par cette voie ne résistent d'ailleurs qu'à l'injection de quelques doses mortelles de toxine seulement, leur sérum est très peu antitoxique. Si l'on veut rendre un cobaye beaucoup plus résistant, il faut de toute nécessité recourir à la voie sous-cutanée. Injectons donc à des cobayes 1 cent. cube d'anatoxine sous la peau de l'abdomen. Au bout d'un mois, prélevons leur quelques centimètres cubes de sang, puis, injectons-leur des quantités de toxine allant de

10 à 500 doses mortelles. Ces cobayes résistent à l'injection sous-cutanée ou intracérébrale de 100 à 500 doses mortelles. Leur sérum neutralise, à la dose de 0,1 cent. cube presque toujours 10 doses mortelles de toxine, parfois 100 doses mortelles (1).

Il serait difficile, devant de tels faits, de nier le rôle de l'antitoxine dans la résistance de ces cobayes; difficile de soutenir que cette antitoxine n'a aucun accès auprès des centres nerveux. Nous voyons ici que la résistance de l'encéphale est proportionnelle au taux antitoxique des humeurs puisqu'il suffit de faire croître la valeur antitoxique du sang pour accroître automatiquement la résistance du cerveau.

Ainsi, non seulement il n'est pas nécessaire de mettre l'antigène directement au contact des centres nerveux pour rendre ceux-ci réfractaires à l'injection de toxine, mais encore le meilleur moyen pour y parvenir est d'injecter l'antigène sous la peau.

VI. — MÉCANISME DE LA RÉSISTANCE À L'ÉPREUVE CÉRÉBRALE CHEZ LE COBAYE VACCINÉ.

Nous nous en tiendrions là, persuadé que notre démonstration est suffisante, si on ne pouvait nous faire l'objection suivante : La résistance du cerveau à l'injection intracérébrale de toxine n'est qu'une apparence; elle est due uniquement à la neutralisation sur place de la toxine par le seul fait d'une hémorragie résultant de l'injection. Cet accident opératoire, l'extravasation de sang antitoxique, signalé par Roux et Borrel, serait, d'après ces auteurs, à peu près inévitable.

Une telle interprétation ne saurait être admissible dans les conditions où nous avons opéré. Si le sang de nos cobayes était doué de propriétés antitoxiques très grandes, elle serait vraisemblable; mais, chez la plupart de nos cobayes, le sang n'est que très peu antitoxique. Dans ces conditions, il est douteux qu'une hémorragie locale, même importante, puisse saturer

(1) Bien mieux, au cours d'essais récents, nous avons constaté que des cobayes, vaccinés par deux injections de 1 et de 2 c.c. d'anatoxine, résistent parfaitement à l'injection intracérébrale de 15.000 et 20.000 doses mortelles de toxine.

in loco la toxine injectée. C'est ce que l'expérimentation est venue nous démontrer :

Le 28 juin 1924, 5 cobayes de 350 grammes reçoivent 0 c. c. 1 d'anatoxine dans un hémisphère cérébral; le même jour, 3 cobayes de poids égaux reçoivent chacun une dose égale de la même anatoxine sous la peau de l'abdomen. Le 28 juillet suivant, ces 8 cobayes sont tous éprouvés par injection intracérébrale de quantités variables de toxine tétanique, *quantités toujours mortelles pour les témoins*. Cette épreuve a donné les résultats suivants :

1^o *Vaccination intra-cérébrale.*

Cobaye n° 95, 1 dose mortelle, tétanos le 31, mort le 2 août.

Cobaye n° 62, 2 doses mortelles, tétanos fruste, survit.

Cobaye n° 48, 2 doses mortelles, pas de tétanos.

Cobaye n° 44, 5 doses mortelles, tétanos le 31, mort le 2 août.

Cabaye n° 50, 5 doses mortelles, pas de tétanos.

2^o *Vaccination sous-cutanée.*

Cobaye n° 88, 1 dose mortelle, pas de tétanos.

Cobaye n° 84, 2 doses mortelles, pas de tétanos.

Cobaye n° 94, 5 doses mortelles, pas de tétanos.

3^o *Témoins.*

Cobaye n° 17, 1 dose mortelle, tétanos le 31, mort le 2 août.

Cobaye n° 42, 2 doses mortelles, tétanos le 30, mort le 31.

Cobaye n° 58, 5 doses mortelles, tétanos le 30, mort le 31.

Avant de procéder à l'injection d'épreuve nous avons prélevé à tous ces cobayes quelques centimètres cubes de sang. Les sérum que nous avons obtenus ont été mélangés à la dose fixe de 0 c. c. 1 à des quantités variables de toxine tétanique. Ces quantités ont été déterminées de la façon suivante : Le cobaye 62 a reçu en injection intracérébrale deux doses mortelles de toxine, son sérum est mélangé à deux doses mortelles de toxine. Ainsi des autres, soit :

Pour les sérum 95 et 88 1 dose mortelle.

Pour les sérum 48 et 84 2 doses mortelles.

Pour les sérum 44, 50 et 94 5 doses mortelles.

Si, parmi ceux de ces cobayes qui ont résisté à l'injection intracérébrale de toxine, il en est un seul qui doive sa survie à la neutralisation sur place de la toxine par du sang extravasé,

le mélange toxine-sérum correspondant, tel que nous venons de l'effectuer, doit laisser indemne le cobaye neuf auquel on l'injectera dans le cerveau.

Chacun de ces mélanges a été injecté dans le cerveau d'un cobaye neuf, sous le volume total de 0 c. c. 2. Pas un seul des cobayes ainsi traités n'a survécu à cette injection, tous sont morts de téтанos à peu près en même temps que les témoins. C'est donc qu'aucun de ces sérums n'était capable de neutraliser, à la dose à laquelle ils ont été employés, les quantités de toxine auxquelles ils ont été respectivement mélangés.

Ceci nous montre que chez ces cobayes vaccinés, une hémorragie cérébrale de 0 c. c. 1 aurait été incapable de neutraliser la toxine introduite dans le cerveau, incapable par conséquent d'assurer à elle seule leur survie. Nous pensons qu'une hémorragie de cet ordre de grandeur est loin de se produire à chaque injection intracérébrale; il y a loin d'un accident de cette importance à l'hémorragie minuscule, d'ordre microscopique, dont parlent Roux et Borrel.

A quel mécanisme attribuer, dans ces conditions, la résistance de nos cobayes? Les faits que nous avons observés au cours d'une expérimentation qui a porté sur plus de 500 cobayes nous laissent penser que la résorption et la neutralisation de la toxine introduite dans le cerveau n'obéissent pas à des règles particulières mais qu'elles sont soumises aux mêmes lois que dans toute autre partie de l'organisme.

VII

Ainsi, des faits expérimentaux incontestables nous montrent que, quel que soit le lieu d'injection de l'antigène, quelle que soit la voie d'inoculation de la toxine d'épreuve, l'immunité activement acquise contre le téтанos se présente avec des caractères d'une rigoureuse fixité.

En aucun cas, nous n'avons constaté d'immunité tissulaire, locale de l'encéphale; jamais nous n'avons enregistré un seul fait capable de faire admettre une production surabondante d'antitoxine de la part des centres nerveux. Toujours d'ordre général, l'immunité antitétanique relève uniquement de la

présence de l'antitoxine spécifique dans l'organisme et nous ne pouvons, pour terminer, que répéter ce que nous avons dit dans toutes nos publications sur ce sujet : *Il n'y a pas d'immunité acquise contre le téтанос sans antitoxine humorale aisément décelable.*

BIBLIOGRAPHIE

DESCOMBEY : *C. R. S. B.*, **92**, 1925, p. 482; *Ces Annales*, **39**, 1925, p. 485; *Thèse vétérinaire*, Paris, 1927; *C. R. A. S.*, **188**, 1929, p. 352.

DMITRIEWSKY : *Ces Annales*, **12**, 1898, p. 148.

MARIE : *C. R. S. B.*, **62**, 1907, p. 1169.

MUTERMILCH et SALAMON : *C. R. A. S.*, **188**, 1929, p. 205 et 350.

ROUX et BORREL : *Ces Annales*, **12**, 1898, p. 225.

**ACTION DES DIASTASES
ET DES FACTEURS MICROBIENS SOLUBLES
SUR L'ÉCLOSION DES ŒUFS DURABLES
DU MOUSTIQUE DE LA FIÈVRE JAUNE**

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

par E. ROUBAUD et J. COLAS-BELCOUR.

Le Stégomyia de la fièvre jaune peut pondre deux catégories physiologiques d'œufs (1). Les uns, *œufs actifs*, éclosent spontanément sans délai, dans une eau quelconque; les autres, ou *œufs durables*, que l'on peut appeler également *œufs inactifs*, sont inaptes à l'éclosion spontanée dans une eau pure ou peu souillée de germes microbiens. Ils peuvent demeurer ainsi pendant des mois entiers sans libérer leur larve.

Comme l'a vu le premier l'auteur anglais Bacot (2), les microorganismes présents dans les eaux paraissent exercer une action favorisante sur l'éclosion de ces œufs. Si l'on ajoute à de l'eau de robinet, renfermant des œufs à l'état latent du moustique, une eau souillée par des microbes divers ou des levures, on assiste d'ordinaire à une éclosion rapide des petites levures. Le phénomène est facile à constater en se servant, par exemple, d'infusion de foin, ou d'une eau renfermant une macération végétale quelconque. Parfois, le développement des larves survient en quelques minutes; d'autres fois, l'éclosion, plus lente, nécessite un délai de un à plusieurs jours pour se manifester.

Bacot, avec Atkins (3), a effectué de nombreuses recherches en milieu stérile pour tenter d'approfondir la raison de l'influence favorisante exercée par les microorganismes des eaux de développement sur l'éclosion. Pour cet auteur, le *stimulus* micro-

(1) Voir: E. Roubaud, L'Eclosion de l'œuf et les stimulants d'éclosion chez le moustique de la Fièvre Jaune. *C. R. Acad. des Sciences*, **185**, 13 juin 1927.

(2) *Jl. R. Microsc. Soc.*, février 1917, p. 173.

(3) *Parasitology IX*, 1917, p. 482.

bien de l'éclosion ne serait autre chose qu'une attraction odorante qui, impressionnant le sens olfactif des jeunes larves, les inciterait à désoperculer leur œuf pour parvenir dans un milieu de développement approprié à leur développement rapide.

L'action odorante excitante serait liée aux corps microbiens vivants eux-mêmes, car les cultures tuées ou les filtrats microbiens ne semblent pas exercer d'action favorable sur l'éclosion. Les nombreuses recherches effectuées par ces auteurs ne permettent pas à vrai dire une compréhension satisfaisante des phénomènes. Aussi avons-nous tenté de les reprendre en partant des mêmes données. Les résultats de nos recherches ont été précédemment sommairement exposés (1). Nous les développons ici (2).

Nous avons tout d'abord confirmé le rôle favorisant exercé par certaines cultures microbiennes vivantes sur l'éclosion des œufs latents du moustique. Des œufs, préalablement stérilisés au sublimé ou à l'eau oxygénée, ont été immersés dans des suspensions vivantes de *B. coli*, de *sarcine jaune*, de *Torulas*, etc. Dans tous les cas, nous avons obtenu une éclosion rapide des jeunes larves qui se sont développées facilement jusqu'à l'état imaginal, en s'alimentant exclusivement des éléments microbiens qu'elles raréfient considérablement au cours de leur croissance.

En présence de ces résultats qui confirment nettement le rôle favorisant des microbes et des larves reconnu par Bacot, nous avons cherché à analyser le phénomène de manière à mettre en évidence l'élément actif réel de l'action stimulante.

Les différentes expériences et leurs résultats sont exposés ci-après. Pour les expériences en condition stérile, nous nous sommes servis de pontes déposées en milieu stérile par des femelles, à la surface d'eau stérilisée, et conservées pendant au moins un jour à 25-28° avant d'être utilisées pour les expériences. Les œufs en expérience étaient préalablement stéri-

(1) *C. R. Acad. des Sciences*, 184, 21 janvier 1927, p. 248.

(2) Nous ne détaillerons ici que les expériences dans lesquelles un contrôle rigoureux avec des œufs témoins placés en eau stérile a pu être effectué. L'éclosion des œufs de *Stéromyia* est, en effet, si pleine de surprises en raison de son caractère essentiellement variable et imprévu, qu'il est indispensable de contrôler étroitement les essais. La simple agitation des œufs, lors de leur passage d'un milieu à un autre, peut provoquer des éclosions qui faussent l'interprétation des résultats.

lisés à l'eau oxygénée ou au sublimé. Autant que possible, nous employions les œufs d'une même ponte pour la même expérience. Pour obtenir des résultats bien démonstratifs, il est préférable de ne pas commencer les expériences avec des œufs de quatre ou cinq jours, qui peuvent être déjà aptes à l'éclosion sous l'influence seule des excitations mécaniques liées aux opérations de transfert et de stérilisation. Les œufs de vingt-quatre heures sont préférables.

I. — LES SOLUTIONS ORGANIQUES STÉRILES SONT SANS ACTION SUR L'ÉCLOSION.

Dans une première catégorie de recherches, nous avons cherché à reconnaître si le stimulus favorable à l'éclosion n'était pas lié au simple passage de l'œuf dans des liquides organiques de concentration osmotique différente. Des œufs déposés en eau stérile par les femelles, ayant résisté à l'éclosion dans les délais normaux, ont été placés, après stérilisation par l'eau oxygénée ou le sublimé à 1 p. 1.000, dans des solutions organiques stériles diverses : bouillon ordinaire autoclavé, albumine, peptone filtrés. Tous les résultats ont été négatifs, quand les témoins dans l'eau distillée stérile sont restés également négatifs.

Par exemple, nous détaillerons une expérience négative faite avec la peptone.

Le 4 janvier 1927, une solution de peptone de Witte à 1 p. 100 est répartie en deux tubes.

Le tube I renferme parties égales de la solution peptonée et d'eau de robinet stérile + 4 œufs de *Stégomyia* stériles, viables.

Le tube II renferme 1 partie de la solution peptonée stérile, pour 3 parties d'eau de robinet + 2 œufs de *Stégomyia* stériles, viables.

Un tube témoin renferme 3 œufs de la même ponte stérilisée, en eau de robinet stérilisée.

Le tableau I suivant exprime les résultats négatifs d'éclosion constatés dans tous les tubes.

TABLEAU I. — Peptone.

	5 JANVIER	6 JANVIER	7 JANVIER	8 JANVIER	9 JANVIER	10 JANVIER	11 JANVIER
Tube I . .	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Tube II . .	00	00	00	00	00	00	00
Tube témoin . .	000	000	000	000	000	000	000

Nous avons constaté de même que les solutions stériles en concentrations diverses de produits simples de fermentation ou de digestion des protides : urée, glycocolle, alanine, indol, de même que les solutions renfermant des acides ou bases de fermentations : acide lactique, ammoniaque, CO₂, etc., étaient également sans influence sur l'éclosion des œufs latents.

Par exemple, nous détaillerons ici deux expériences réalisées avec l'indol et le gaz carbonique le 16 Décembre.

Expériences sur l'action de l'indol. — Une solution aqueuse à saturation à chaud d'indol dans de l'eau de robinet est répartie en concentrations diverses en 5 tubes, qui reçoivent également un certain nombre d'œufs provenant d'une ponte en eau stérile latente, mais reconnue viable.

Tube I. — Renferme une solution aqueuse saturée d'indol diluée au 1/10 dans l'eau de robinet + 6 œufs.

Tube II. — Renferme une solution aqueuse saturée d'indol diluée au 1/5 dans l'eau de robinet + 6 œufs.

Tube III. — Renferme une solution aqueuse saturée d'indol diluée au 1/4 dans l'eau de robinet + 6 œufs.

Tube IV. — Renferme une solution aqueuse saturée d'indol diluée au 1/3 dans l'eau de robinet + 6 œufs.

Tube V. — Renferme une solution aqueuse saturée d'indol diluée au 1/2 dans l'eau de robinet + 6 œufs.

Un tube témoin, T renferme de l'eau de robinet stérile + 6 œufs.

L'expérience commencée le 16 décembre donne les résultats négatifs exposés dans le tableau II suivant.

TABLEAU II. — Indol.

	17 DÉCEMBRE	18 DÉCEMBRE	19 DÉCEMBRE	20 DÉCEMBRE	21 DÉCEMBRE	22 DÉCEMBRE	23 DÉCEMBRE	24 DÉCEMBRE
Tube I.	0	0	0	0	0	0	0	0
Tube II.	0	0	0	0	0	0	0	0
Tube III.	0	0	0	0	0	0	0	0
Tube IV.	0	0	0	0	0	0	0	0
Tube V.	0	0	0	0	0	0	0	0
Tube T.	0	0	0	0	0	0	0	0

Expériences sur l'action du gaz carbonique. — Cette série d'expériences a été réalisée avec de l'eau de seltz commerciale, non stérilisée, et diluée de façons diverses dans les conditions suivantes :

Tube I. — Renferme 1 partie d'eau de seltz pour 24 parties d'eau de robinet stérile + 6 œufs de la même ponte latente que l'expérience précédente.

Tube II. — Renferme 1 partie d'eau de seltz pour 19 parties d'eau de robinet stérile + 6 œufs.

Tube III. — Renferme 1 partie d'eau de seltz pour 9 parties d'eau de robinet stérile + 6 œufs.

Tube IV. — Renferme 1 partie d'eau de seltz pour 4 parties d'eau de robinet stérile + 6 œufs.

Tube V. — Renferme une partie d'eau de seltz pour 3 parties d'eau de robinet stérile + 6 œufs.

Tube VI. — Renferme parties égales d'eau de seltz et d'eau de robinet stérile.

Témoin T. — En eau de robinet stérile + 6 œufs.

Les résultats entièrement négatifs sont exprimés par le tableau III ci-après.

TABLEAU III. — *Co²*.

	46 DÉCEMBRE	47 DÉCEMBRE	48 DÉCEMBRE	49 DÉCEMBRE	20 DÉCEMBRE
Tube I.	0	0	0	0	0
Tube II.	0	0	0	0	0
Tube III.	0	0	0	0	0
Tube IV.	0	0	0	0	0
Tube V.	0	0	0	0	0
Tube VI.	0	0	0	0	0
Tube T.	0	0	0	0	0

II. — LES FILTRATS NON CHAUFFÉS DE CULTURES MICROBIENNES OU DE LEVURES EXERCENT UNE INFLUENCE FAVORISANTE SUR L'ÉCLOSION.

Nous avons tenté de reconnaître si le stimulus favorisant de l'éclosion n'était pas constitué par un des produits vivants solubles de l'activité microbienne. Nous avons pu constater que certains filtrats non toxiques pour les larves favorisaient leur éclosion d'une manière appréciable. Nous avons préparé des filtrats de culture de quarante-huit heures en bouillon de *B. coli* isolé de l'eau, de sarcine jaune de l'eau, et d'une levure (*Torula*) isolée du tube digestif d'un moustique, *Theobaldia annulata*.

Les expériences faites avec les filtrats de *Coli* n'ont pas donné de résultats apparents rapides. Il a été reconnu ultérieurement que ces filtrats exerçaient pourtant une action stimulante positive, mais lente sur les larves renfermées dans les œufs. Les dilutions de 1/5 à 1/50 ne se sont pas montrées nettement actives. Mais à l'état pur, sur 7 œufs placés au contact d'un filtrat non chauffé, 6 ont éclos dans un délai de deux jours à trois semaines. Le témoin de l'expérience était constitué par le

tube d'eau distillée de l'expérience ci-après (Tabl. IV), où quelques éclosions dues à l'agitation mécanique se sont produites à la suite du transport des œufs.

Les filtrats de sarcine jaune, dilués de 4/5 à 1/50, n'ont pas exercé d'influence stimulante appréciable dans les délais de vingt-quatre à quarante-huit heures. Ces filtrats, non dilués, se sont montrés par contre rapidement actifs, ainsi qu'il apparaît dans l'expérience suivante.

EXPÉRIENCE. — Un filtrat sur bougie Chamberland L² de culture en bouillon de sarcine jaune conservée à la température de laboratoire pendant dix jours a été réparti en deux tubes.

L'un, tube I, renferme le filtrat normal, auquel sont ajoutés le 2 février 10 œufs de Stégomyia provenant d'une ponte en eau stérile, et stérilisés à l'eau oxygénée.

Le tube II renferme le même filtrat *autoclavé*, auquel sont ajoutés le 2 février 6 œufs de la même ponte stérilisés à l'eau oxygénée.

Un tube témoin T renfermait 6 œufs déposés en eau de robinet stérilisée.

Les résultats sont exprimés par le tableau IV ci-après, où les croix indiquent le nombre d'œufs appelés à l'éclosion dans chacun des milieux.

TABLEAU IV. — **Filtrat de sarcine.**

	2 FÉVRIER	3 FÉVRIER
Tube I (non chauffé)	+++00.00000	+++++
Tube II (autoclavé)	+00 000	+++000
Tube témoin.	-+0 000	++0000

Les résultats sont rendus moins nets que ceux de l'expérience du tableau V, par la présence de quelques éclosions spontanées dans le tube de filtrat autoclavé.

Mais, dans cette expérience, une partie des œufs de la ponte en eau stérile se sont montrés aptes à l'éclosion sub-immédiate, dans la proportion de 1/6, sous l'effet de l'agitation mécanique seule (œufs subactifs). C'est à cette propriété que sont dues les éclosions partielles constatées dans le tube II ainsi que dans le tube témoin. Mais l'éclosion *totale* observée dans le tube renfermant le filtrat non chauffé fait ressortir une action favorisante manifeste du filtrat en question, par rapport

au filtrat chauffé ou à l'eau stérile. Dans ces deux derniers milieux, même après trente jours de contact, les œufs non éclos le troisième jour ne libérèrent pas leurs larves.

L'expérience la plus probante a été réalisée avec un filtrat de *Torula* de *Theobaldia* provenant d'une culture en bouillon légèrement glucosé, filtré sur bougie Chamberland L².

L'expérience, faite le 20 décembre 1926, a été réalisée de la façon suivante :

Tube I. — Le filtrat est dilué dans la proportion d'une partie d'eau de robinet stérilisée pour deux parties de filtrat. 7 œufs d'une ponte en eau stérile, lavés à l'eau oxygénée, sont ajoutés à la solution.

Tube II. — Le filtrat est dilué à parties égales avec l'eau de robinet. Le tube reçoit 6 œufs stérilisés de la même ponte.

Un tube témoin T, d'eau de robinet stérile reçoit également 6 œufs stérilisés de la même ponte.

Les résultats exprimés par le tableau V ci-après montrent l'influence stimulante caractéristique exercée par le filtrat. Tandis qu'un œuf seulement est parvenu à l'éclosion dans les quarante-huit heures, dans le tube témoin, tous les œufs mis en expérience sont éclos au bout de vingt-quatre heures dans les deux solutions de filtrat actif.

TABLEAU V. — FILTRAT DE TORULA NON CHAUFFÉ.

	20 DÉCEMBRE	21 DÉCEMBRE	22 DÉCEMBRE
Tube I	0000 000	++++ +++	++++ +++
Tube II	000 000	+++ +++	+++ +++
Témoin	000 000	+00 000	+00 000

III. — LES DIASTASES DIGESTIVES FAVORISENT L'ÉCLOSION DES ŒUFS DURABLES. LA PROPRIÉTÉ STIMULANTE EST LIÉE À L'EXERCICE DES PROPRIÉTÉS DIGESTIVES ACTIVES DE CES FERMENTS.

En présence des résultats obtenus par l'action des filtrats de levures ou de bactéries nous avons été amenés à conclure que

la propriété stimulante dévolue aux micro-organismes des eaux dépendait des ferment solubles actifs sécrétés par eux. Afin de nous confirmer dans cette manière de voir nous avons alors institué d'autres expériences en nous adressant directement aux diastases digestives animales ou végétales, qu'il est plus facile de doser dans les filtrats et de faire agir à l'état pur, sans la présence de toxines ou d'excreta toxiques pour les larves renfermées dans les œufs. Nous avons effectué différentes expériences en utilisant des solutions stériles, en concentrations diverses, de pepsine, de trypsine et de pancréatine.

Ces solutions étaient stérilisées par filtration sur bougie puis on les faisait agir sur des œufs durables également stérilisés à la suite d'un passage à plusieurs reprises dans l'eau oxygénée.

A. ACTION STIMULANTE EXERCÉE PAR LES FERMENTS DIGESTIFS ACTIFS.

EXPÉRIENCE I. *Action de la pepsine et de la trypsine.* — Dans cette première expérience, nous avons étudié l'action de la pepsine et de la trypsine, en partant : d'une part d'une solution à 1 p. 100 de pepsine extractive dans l'eau de robinet, stérilisée par filtration sur bougie Chamberland ; d'autre part d'une solution de trypsine à saturation à froid dans l'eau de robinet, stérilisée également sur bougie.

Les œufs de *Stegomyia* expérimentés provenaient d'une ponte du 27 décembre effectuée en eau stérile. Ces œufs, recueillis le 29, furent stérilisés par l'eau oxygénée, puis ensemencés dans les différents tubes, dans les conditions suivantes :

Tube I. — Renferme une solution de pepsine à 1 p. 100 + 4 œufs.

Tube II. — Solution de pepsine à 1 p. 100 diluée de son volume d'eau de robinet stérile + 4 œufs.

Tube III. — Solution de pepsine à 1 p. 100 étendue de trois fois son volume d'eau stérile, + 6 œufs.

Tube IV. — Solution de trypsine à saturation à froid + 6 œufs.

Tube V. — Solution de trypsine précédente étendue de son volume d'eau stérilisée + 4 œufs.

Tube VI. — Solution de trypsine étendue de trois fois son volume d'eau stérilisée + 6 œufs.

Un tube témoin, renfermant de l'eau de robinet stérile reçoit également 7 œufs.

L'expérience a été faite comme toutes les autres à la température de l'étuve, 25-28° C.

Les résultats exprimés par le tableau VI font ressortir l'action

stimulante très nette exercée par les solutions diastasiques sur l'éclosion ; les larves écloses sont indiquées par une croix.

TABLEAU VI. — Action de la pepsine et de la trypsine non chauffées.

	30 DÉCEMBRE	31 DÉCEMBRE	1 ^{er} JANVIER	2 JANVIER	3 JANVIER
Tube I. . .	0000	++++	++++	+++	+++
Tube II. . .	0000	++	++0	++0	++0
Tube III. . .	000000	+00000	+00000	+00000	+00000
Tube IV. . .	000000	++0000	++0000	++0000	++0000
Tube V. . .	0000	0000	0000	0000	++0
Tube VI. . .	000000	000000	++0000	++0000	++0000
Tube témoin. . .	0000000	0000000	+000000	+000000	+000000

L'expérience fait également ressortir que la rapidité de la réponse d'éclosion est généralement en rapport avec la concentration en diastase active des solutions.

EXPÉRIENCE II. *Action de la papaïne sur l'éclosion.* — Une solution à 1 p. 100 de papaïne, faite à froid, est filtrée sur bougie puis répartie le 4 janvier en 3 tubes dans les conditions suivantes :

Tube I. — Solution de papaïne à 1 p. 100. Dans cette solution sont ensemencés trois œufs provenant d'une ponte stérilisée du jour même.

Tube II. — Solution de papaïne à 1 p. 100 étendue de son volume d'eau de robinet stérile. 4 œufs de la même ponte sont ensemencés.

Tube III. — Solution de papaïne étendue de 3 trois fois son volume d'eau stérilisée. 3 œufs sont ensemencés.

Un tube témoin renfermant de l'eau de robinet stérile est ensemencé de 3 œufs du même lot.

Les résultats sont exprimés par le tableau VII, ci-après.

TABLEAU VII. — Action de la papaïne non chauffée.

	5 JANVIER	6 JANVIER	7 JANVIER	8 JANVIER	9 JANVIER	10 JANVIER	11 JANVIER
Tube I. . .	000	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tube II. . .	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Tube III. . .	000	000	+00	+00	+00	+00	+00
Témoin . . .	000	000	000	000	000	000	000

L'expérience montre que la solution la plus concentrée, comme dans le cas précédent, a été la plus active et la plus rapide d'action.

B. DISPARITION DE L'ACTION STIMULANTE PAR LE CHAUFFAGE. — Nous avons effectué comparativement les mêmes expériences en utilisant des solutions de ferments autoclavées à 120° C pendant vingt minutes. L'expérience III ci-après, effectuée en même temps que l'expérience II, a porté sur les trois ferments: peptique, tryptique et papaïnique dans les conditions expérimentales ci-après. Les œufs de *Stégomyia* expérimentés appartenaien au même lot de ponte du 4 janvier 1927 que ceux de l'expérience II, à laquelle l'expérience III peut servir de témoin.

EXPÉRIENCE III. Action nulle des ferments autoclavés.

Tube I. — Renferme une solution de pepsine à 1 p. 100 autoclavée. 5 œufs stérilisés de *Stégomyia* sont ensemencés.

Tube II. — Renferme une solution de pepsine à 1 p. 100 autoclavée, additionnée de son volume d'eau de robinet stérile. 6 œufs sont ensemencés.

Tube III. — Renferme une solution de pepsine à 1 p. 100 autoclavée étendue de trois fois son volume d'eau de robinet stérile. 4 œufs sont ensemencés.

Tube IV. — Renferme une solution de trypsine, à 1 p. 100 autoclavée. 3 œufs sont ensemencés.

Un tube témoin T est ensemencé de 3 œufs en eau stérile.

Le tableau VIII fait ressortir *le caractère entièrement négatif des résultats.*

TABLEAU VIII. — Action des ferments chauffés.

	5 JANVIER	6 JANVIER	7 JANVIER	8 JANVIER	9 JANVIER	10 JANVIER	11 JANVIER
Tube I. .	00000	00000	00000	00000	00000	00000	00000
Tube II. .	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000
Tube III. .	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Tube IV. .	000	000	000	000	000	000	000
Témoin. .	000	000	000	000	000	000	000

C. L'ADDITION DE NOUVELLE QUANTITÉ DE DIASTASE ACTIVE RANIME L'ACTION STIMULANTE DÉTRUIITE PAR LE CHAUFFAGE. — Reprenant les données négatives de l'expérience III précédente, nous avons

voulu voir si l'addition de diastases correspondantes actives provoquerait bien la reprise de l'activité stimulante, détruite, avec les propriétés digestives, par le chauffage à 120° C.

Le 11 janvier 1927, au tubè I de l'expérience III ci-dessus, renfermant une solution de pepsine à 1 p. 100 autoclavée + 5 œufs, est ajouté un demi-volume de pepsine à 1 p. 100 *active*.

Au tube IV renfermant une solution de trypsine à 1 p. 100 autoclavée + 3 œufs est également ajouté un demi-volume de solution *active*.

Le tableau IX exprime les résultats d'éclosion rapide et totale obtenus dans les deux tubes.

TABLEAU IX. — Réactivation des ferment.

	11 JANVIER	12 JANVIER
Tube I.	00000	++++
Tube IV	000	+++

Les solutions organiques inaptes à provoquer l'éclosion sont également rendues actives sur l'éclosion si l'on y ajoute une solution diastasique active. En additionnant le tube II du tableau I (p. 646), renfermant une solution de peptone + 2 œufs, d'une solution de pepsine à 1 p. 100, nous avons obtenu l'éclosion des 2 œufs le jour suivant.

En additionnant le tube I de la même expérience, renfermant une solution de peptone inactive + 4 œufs, d'une solution de papaïne saturée active, nous avons obtenu l'éclosion des 4 œufs le jour suivant.

Ces différentes expériences démontrent la grande efficacité d'action des solutions diastasiques digestives, dans l'éclosion stimulée des œufs de *Stégomyia* inaptes à l'éclosion spontanée. On remarquera que le pouvoir stimulant de ces solutions s'est exercé dans des conditions d'acidité, d'alcalinité ou de température très éloignées de l'optimum d'activité habituel des différentes diastases digestives expérimentées. Mais le degré de concentration relatif des solutions a influé sur la rapidité de la réponse d'éclosion et sur sa netteté.

Certaines de nos solutions, comme par exemple la solution saturée à froid de papaïne, se sont montrées d'ailleurs rapidement funestes pour les larves dont elles avaient provoqué l'éclosion. Les larves écloses furent trouvées mortes dans la solution active de papaïne quelques heures après, et en partie digérées. Le mode d'action de ces stimulants diastasiques sur les œufs latents de l'Aëdine se montre donc tout à fait comparable à celui des solutions d'hypochlorite de soude, qui exercent une action stimulante sur l'éclosion suivie d'une action destructive rapide sur les jeunes larves.

Quelques expériences sur l'action de certaines diastases oxydantes comme la tyrosinase ont paru donner quelques résultats favorables également sur l'éclosion. Mais ces expériences n'ont pas encore été suffisamment contrôlées pour que nous puissions leur donner une acceptation définitive.

Le pouvoir stimulant curieux des diastases digestives, sur l'éclosion des œufs latents de *Stégomyia* apparaît manifestement en rapport avec l'action digestive propre de ces ferment. Le mode d'action réel de ces ferment sur les œufs appelés à l'éclosion ne sera pas discuté ici. L'un de nous l'examinera plus à fond dans un travail d'ensemble. Nous nous bornons quant à présent au simple exposé d'expériences qui, démontrant l'influence spécifique des ferment solubles, confirment et éclairent du même coup l'action jusqu'alors énigmatique exercée par les agents microbiens des eaux sur l'éclosion du moustique de la fièvre jaune, avec les conséquences biologiques et prophylactiques qu'elle comporte.

DU SYSTÈME NERVEUX DANS LES TUMEURS ARTIFICIELLES

par M. MARULLAZ.

II

Dans un précédent article (1) j'ai communiqué les résultats obtenus dans la production de tumeurs par une modification de la méthode de Yamagiwa. Je puis les confirmer aujourd'hui, en ajoutant que l'on provoque pour ainsi dire certainement le développement de néoplasmes hors de la zone badigeonnée en pratiquant comme je l'ai exposé et en employant du goudron de houille brut. Il faut un certain temps pour réaliser ces productions. Actuellement, je possède 11 lapins porteurs de tumeurs placées en dehors de toute zone badigeonnée; chez l'un d'eux, ces néoplasies ont mis à se développer 283 jours et sont apparues 60 jours après suppression de tout badigeonnage; chez un autre, au contraire, la production du néoplasme a été très rapide, puisque celui-ci s'est formé en 15 jours seulement après le premier goudronnage. Entre ces deux extrêmes limites de temps, j'ai noté des délais de 109 jours, 121 jours, 130 jours, 138 jours, 150 jours, 178 jours, 210 jours, 226 jours, 231 jours; ce dernier cas a fourni une récidive de voisinage 20 jours après excision de la tumeur et de la portion de l'oreille où elle siégeait.

Le lapin 52, cage 36, dont il a été question antérieurement a présenté l'évolution remarquable que voici.

Après l'excision de la tumeur primitive, le 21 février 1928, j'ai repris, le 28 du même mois, le badigeonnage au goudron de la pointe de la face interne et de la base de la face externe de l'oreille droite. Le 4 mars 1928, apparition d'une petite tumeur dans le voisinage immédiat du siège de la première,

1. Ces *Annales*, 43, décembre 1928, p. 1513.

donc dans la partie goudronnée de la face interne. 13 mars 1928, à la base de la face externe l'épiderme a l'aspect mortifié; oreille très sensible, état général moins bon. 20 mars 1928, l'animal semble mieux; mêmes symptômes locaux. Du 27 mars



FIG. 1. — Lapin 52, cage 36. Oreille droite, face interne, avec de multiples tumeurs artificielles du goudron.

au 17 avril, on note un développement progressif du processus néoformatif dans la zone goudronnée; on y constate la présence de 5 tumeurs relativement volumineuses et de 3 plus petites; l'oreille est très sensible à sa face interne. 23 avril 1928, la sensibilité persiste; les tumeurs préexistantes grossis-

sent; de nouvelles se développent à la face interne. Sur le tégument de la face externe, près de la pointe de l'oreille, on voit apparaître une petite tubérosité; la sensibilité est toujours exagérée à la base de la face externe.

Après avoir photographié l'animal le 3 mai 1928, on injecte 1 cent. cube d'alcool goudronné à la base de la face externe de l'oreille droite, en le répartissant en trois points, c'est-à-dire sur les trajets des trois branches des nerfs auriculaires, postérieur et antérieur. 8 mai 1928, l'oreille injectée paraît lourde; les tumeurs de la face interne semblent se flétrir un peu à leur sommet; rien à signaler à la face externe. 15 mai 1928, les tumeurs de la face interne ont un aspect plus raccorni que précédemment, bien que s'étant un peu agrandies; l'une d'elles a traversé l'épaisseur de l'oreille et fait saillie sur l'autre face sous forme d'une protubérance cornée aplatie, de la grandeur d'un demi-grain de seigle. Dans la partie goudronnée de la base de la face externe, on constate l'existence de nombreuses tumeurs épidermiques frangées, attachées au poil par le goudron; ces productions existent aussi dans la partie de la peau du cou faisant vis-à-vis à la région badigeonnée de l'oreille. 30 mai 1928, les formations néoplasiques ont grandi, tant à la face externe qu'à la face interne. L'aspect de l'oreille est un peu modifié par l'excès des productions cornées, la peau se fissure et saigne facilement; l'oreille elle-même paraît très lourde. Pour favoriser la cicatrisation des petites plaies cutanées, on suspend tout traitement au goudron. 5 juin 1928, reprise du badigeonnage. 11 juin 1928, l'oreille est plus souple; les tumeurs plus désséchées, perdent leur revêtement corné; l'une d'elles tombe en créant dans la zone goudronnée de la face interne une perte de substance de 4 millimètres carrés environ. 26 juin 1928, on note un accroissement général des tumeurs à la face externe comme à la face interne, l'animal paraît abattu. 3 juillet 1928, état de santé satisfaisant, appétit bon. Jusqu'au 7 août 1928, on ne remarque aucun incident particulier, sauf l'augmentation continue mais mesurée des productions néoplasiques à l'intérieur et à l'extérieur de l'oreille. 14 août 1928, l'agrandissement de ces productions cutanées est remarquable. La peau est très sensible et saigne facilement. Le même fait se constate dans la partie du cou située en face de la zone goudronnée de l'oreille,

et où sont implantées de nombreuses petites tumeurs charnues et rosées. 28 août 1928, la croissance des néoplasmes continue sur tous les points, dans les parties non traitées comme dans celles qui ont été badigeonnées dès le début; suspension de toute manipulation. 30 octobre 1928, malgré la suppression du goudronnage les tumeurs ont conservé leur taille; on constate à la face interne de l'oreille droite, un épaississement œdémateux de la peau d'environ 4 centimètres sur 2 centimètres englobant les productions néoplasiques de la région, plus ou moins fissuré, laissant suinter à sa surface un liquide séropurulent à odeur fétide. A la face externe de l'oreille, la peau entre les tumeurs a un aspect normal dans la moitié supérieure de l'organe; dans la moitié inférieure, elle est œdématisée, ainsi que le pédicule des néoplasmes qui s'y trouvent implantés. En maintenant l'oreille verticale, cette formation d'œdème diminue; la peau se détend et reprend le même aspect que celle du reste de l'oreille. Devant cet état de choses on surseoit à la reprise du badigeonnage. 15 novembre 1928, l'animal est sacrifié au chloroforme. $P = 3$ kilogr. 280. Rien de particulier n'apparaît à l'examen des différents organes. Poids de l'oreille gauche normale : *13 grammes*; poids de l'oreille droite traitée : *98 grammes*.

Celle-ci a donc été premièrement goudronnée dans le tiers supérieur de sa face interne, puis également dans le tiers inférieur de sa face externe. On voit que la face interne, dans sa moitié supérieure — le goudron s'étale toujours en se ramollissant sous l'action de la chaleur animale, et du tiers supérieur où il a été appliqué, finit par recouvrir en réalité la moitié correspondante de l'organe — est porteuse de nombreuses formations néoplasiques, conglomérées du côté antérieur, ailleurs isolées ou groupées irrégulièrement, dont la taille varie de celle d'un pois à celle d'une cerise, largement sessiles, à surface inégale, en chou-fleur.

Dans la moitié inférieure qui n'a jamais reçu de goudron, on trouve quelques petites tumeurs de forme et de taille irrégulières, largement implantées sur le tégument au voisinage de la zone badigeonnée. Le reste de la peau a un aspect grossièrement granuleux et présente quelques taches irrégulières de congestion, comme on en trouve dans les catarrhes auriculaires chroniques.

La peau de la face externe de l'oreille est restée en général normale dans la moitié supérieure; on y remarque la présence de trois nodosités, régulièrement arrondies, de consistance élastique, rénitente, à surface lisse, où le poil semble plus clairsemé, largement sessiles sur le tégument avec quoi elles se raccordent insensiblement, sans aucune relation avec les productions de la face interne dont elles paraissent *tout à fait indépendantes*.

A la base de l'oreille la partie badigeonnée a un aspect très spécial. Fortement épaisse, à surface irrégulièrement mammelonnée et frangée, elle forme, à son bord supérieur, un repli de largeur inconstante, recouvrant un sillon nettement marqué qui la sépare de la zone non goudronnée s'étendant au-dessus d'elle vers la pointe de l'oreille où des tubérosités ont déjà été signalées. A partir du sillon, la peau qui paraît fortement épaisse perd peu à peu son aspect bosselé et anfractueux quoique restant dépourvue de poils. Ce n'est que dans la moitié supérieure que l'on retrouve tous ses caractères normaux entre les tubérosités dont il a été fait mention. A la base de l'oreille et dans la partie dont le tégument se prolonge par celui de cou, dans cette région qui n'a pas été badigeonnée mais se trouve en contact avec le goudron appliqué sur la base de l'organe, le poil est conservé et dissimule quelques excroissances nettement pédiculées, ressemblant à de petits choux-fleurs, peu friables à leur surface et secs au toucher. La peau donne la sensation d'être épaisse, mais elle est encore mobile sur les plans profonds.

J'ai pratiqué plusieurs coupes longitudinales de la pièce anatomique. On voit qu'au niveau de l'agglomération de tumeurs signalée dans le tiers supérieur de la face interne, le revêtement cutané, normalement si mince — 1 millimètre à 1 millimètre $\frac{1}{2}$ de hauteur — a une épaisseur triple ou quadruple; il a une consistance ferme, mais il est un peu friable, sa couleur presque blanche tranche distinctement sur la teinte moins claire de la lame.

De l'autre côté de l'oreille, une coupe au travers d'une des tubérosités mentionnées sur la face externe dans sa portion supérieure qui n'a jamais été goudronnée, fait voir que ces nodosités hémisphériques sont constituées par un épaisse-

ment de la peau, au sommet duquel on trouve un épithélium proliféré qui s'avance dans la direction des couches profondes, masse qui est également facilement reconnaissable à sa teinte qui se détache nettement de celle du tissu environnant. La formation en tubérosité est imputable également à une hypertrophie du tissu connectif de la peau, de moins en moins appréciable à mesure que l'on s'éloigne de la masse d'épithélium proliféré, et qui maintient toujours cette dernière à une distance de 2 millimètres au minimum de la lame cartilagineuse qui n'est ainsi jamais touchée. La hauteur maxima de la plus saillante de ces tubérosités est de 5 millimètres, et en ce point, qui correspond à la plaque d'hyperplasie de la face interne, l'épaisseur de l'oreille atteint presque 11 millimètres.

La coupe au travers du tissu hyperplasié de la base face externe montre que celui-ci est absolument semblable à celui que l'on voit au niveau de l'agglomération néoplasique de la face interne. Seule leur surface est notablement plus irrégulière. Là encore, la lame cartilagineuse est intacte, le tégument qui la recouvre à sa face interne, et qui tapisse le cornet est un peu granuleux et présente des symptômes de catarrhe chronique bénin. La hauteur totale de la coupe atteint 16 millimètres au niveau de la base du repli du bord supérieur de cette zone.

Entre celui-ci et la moitié supérieure de la face externe, *région qui n'a jamais été goudronnée*, l'épaisseur de la peau va en diminuant de 10 millimètres à 2 millimètres sur une étendue de 4 centimètres. Dans cette portion, on discerne au sein du tissu hyperplasié de petits nodules gris-jaunâtres, de taille et de forme inégales — les plus volumineux atteignent la grosseur d'un grain de riz, les plus petits ne sont visibles qu'à la loupe — séparés par des travées plus ou moins épaissies de tissu connectif rosé. L'aspect de la coupe rappelle nettement celui du cancer en cuirasse de Velpeau.

En se dirigeant vers la pointe de l'oreille, la peau recouvre peu à peu son épaisseur et ses caractères normaux ainsi qu'on l'a déjà vu du tégument qui environne les tubérosités dont il a été question.

L'examen microscopique confirme l'impression laissée par l'examen macroscopique. On a affaire à un cancer spinocellulaire. Dans la région supérieure de l'oreille, face interne, au

niveau de la plaque de confluence des tumeurs, l'infiltration néoplasique a envahi tout le tégument jusqu'au cartilage dont elle respecte encore une mince couche de périchondre. La peau se trouve ainsi considérablement épaisse — voir figure 4 — et sur les coupes colorées à l'hémalun, présente une teinte bleu-violet. Ce n'est qu'au microscope que l'on retrouve les restes du tissu connectif du derme très mince à l'état normal, dont la ténuité persistante démontre la passivité dans le processus.

La partie goudronnée de la base, face externe, est également, dans toute son épaisseur, envahie par la prolifération néoplasique. Mais le tissu conjonctif sous-cutané étant plus abondant, plus dense que le précédent, a mieux résisté à la dissociation par la prolifération cellulaire, et à la coupe cette partie de la tumeur se présente comme un épithéliome à structure alvéolaire. Là encore la prolifération cellulaire atteint la couche cartilagineuse, mais sans l'entamer. On rencontre en plusieurs points la preuve de la réaction qu'elle provoque toutefois dans ce milieu ; le périchondre est épaisse, sans qu'il y ait la moindre infiltration cellulaire, et entre ses lames néoformées, se développent de nouvelles capsules cartilagineuses. Par endroits, la hauteur totale du tissu normal ainsi hypertrophié est doublée et même triplée.

On a vu que cette région se continue au-dessus du sillon qui la limite dans la direction de la pointe de l'oreille, par une zone d'infiltration néoplasique rappelant à la coupe le cancer en cuirasse de Velpeau. Là, les alvéoles formés par la dissociation du tissu connectif du derme sont plus larges. Leur contenu épithéial n'offre rien de particulier à signaler. Leurs parois sont constituées par des faisceaux du tissu conjonctif pré-existant, auquels s'ajoutent des éléments et des capillaires néoformés, ce qui augmente leur épaisseur ; aucun foyer d'infiltration leucocytaire.

On ne voit pour ainsi dire pas de nerfs dans la partie envahie par la néoplasie tandis que tout près du revêtement épithéial, mais en *tissu encore absolument normal*, dans les couches les plus superficielles du derme on reconnaît la présence de fibres nerveuses à myéline transparente, d'apparence intacte, engainant des cylindres-axes de calibres irréguliers, bien que non agrandi, inégalement imprégnés par l'argent — procédé de Bielschowsky

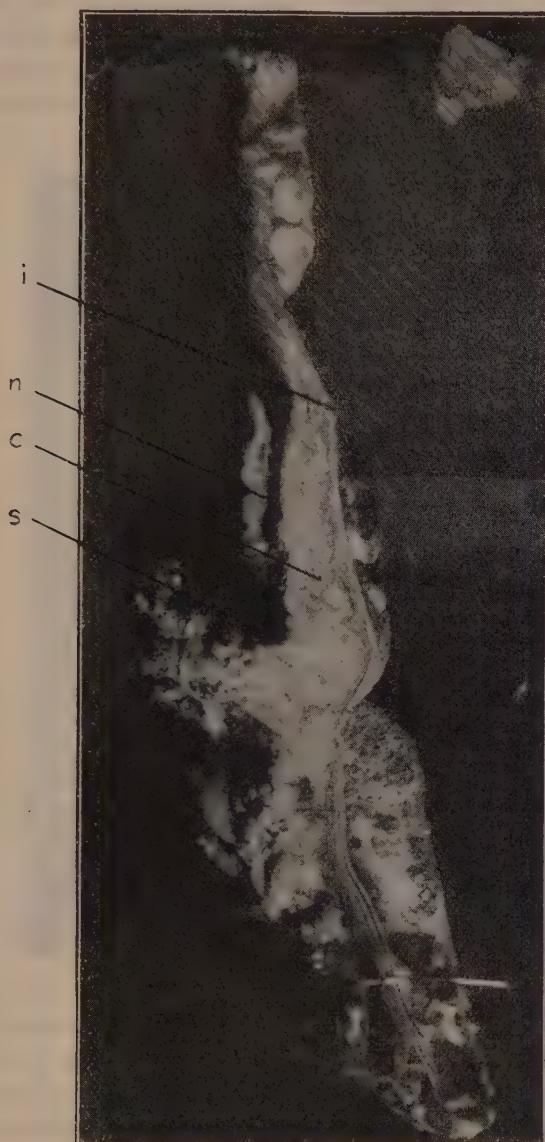


FIG. 2. — Coupe de l'oreille droite à travers les parties les plus hypertrophiées. *i*, limite inférieure de la zone badigeonnée de la face interne; *n*, coupe de la peau saine près du bord postérieur de l'oreille; *c*, masse d'infiltration cancéreuse (cancer en cuirasse); *s*, sillon bordant la zone goudronnée de la base à la face externe. Grandeur naturelle.

à l'oxyde d'argent ammoniacal — ne donnant plus l'impression d'avoir la forme d'un cordon mais celle d'un ruban de largeur inconstante. A plus grande distance, en s'éloignant de la tumeur, on trouve des faisceaux nerveux plus ou moins empe-



FIG. 3. — Cylindres-axes en tissu normal
à proximité immédiate d'une partie envahie par la néoplasie. Gross. : 400 d.

lotonnés, dont la myéline a un aspect normal et dont les caractères des cylindres-axes rappellent ceux des précédents, tout en étant moins marqués.

Dans la profondeur on trouve des fibrilles nerveuses touchant le périchondre hypertrophié, dont l'insuffisance d'imprégnation est évidente quoique moins apparente que dans le voisinage de la néoplasie épithéliale. Les fibres situées en plein tissu

hypertrophié sont également mal teintées par le nitrate d'argent et semblent devoir être classées entre celles de la surface et celles de la profondeur. Sur les coupes d'un autre morceau de la même partie du côté non goudronné, traité par le même procédé de Bielschowski, les éléments nerveux sub-

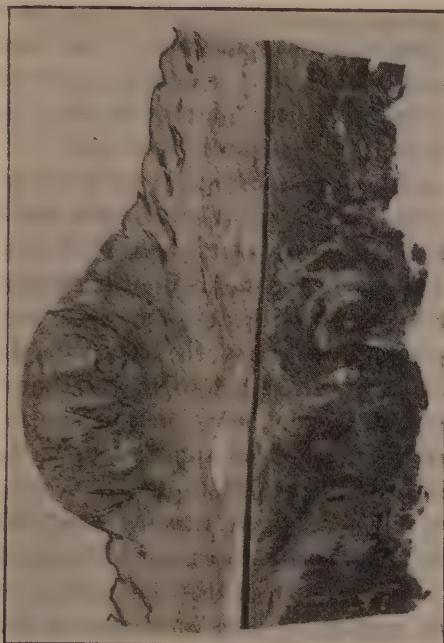


FIG. 4. — Coupe de l'oreille à travers la plus grosse des trois tubérosités et la région dégénérée de la face interne, faisant voir le cartilage et le derme normaux qui les séparent. Gross. : 4 d.

sistant au milieu de la néoplasie, sont encore moins apparents.

En examinant les tubérosités qui se trouvent en pleine peau normale dans la moitié supérieure de la face externe, on se rend compte qu'à leur sommet il se produit une prolifération épithéliale qui, ayant rompu la membrane basale de l'épiderme, envahit le derme, en prenant tous les caractères d'un épithéliome. Le tissu connectif offre une réaction manifeste d'hypertrophie ; son augmentation de volume ajoutée à celle du tissu épithélial néoplasique explique le développement de tubérosités et non pas d'ulcérations.

L'hyperplasie cellulaire ne rompt pas la continuité de la surface du tégument — qui est resté lisse — mais se fait dans la direction de la profondeur. Seules les couches superficielles du derme sont envahies ; à la base du nodule il y a encore une couche de 2 millimètres environ de tissu sain, sans infiltration, qui les sépare encore du cartilage, de l'autre côté duquel on retrouve la tumeur de la face interne. Ainsi les foyers néoplasiques de la face externe sont *tout à fait indépendants des autres* avec lesquels ils n'ont aucune relation de continuité, étant d'autre part environnés eux-mêmes de tous côtés de la peau normale sur laquelle ils se sont développés.

Quant aux petites tumeurs implantées sur la peau du cou qui fait vis-à-vis à la partie badigeonnée de la face externe dans sa portion inférieure, leur constitution anatomique est celle de papillomes en chou-fleur, dont la charpente connective est fournie par le derme assez dense en cette région, et dont le revêtement épithérial est disposé en de nombreuses assises, sans pour cela avoir un caractère malin. Leur formation est vraisemblablement attribuable à l'action sur la peau, exercée par les émanations du goudron appliqué sur la base de l'oreille.

En considérant les caractéristiques de la néoplasie, on voit que l'on est en présence d'une tumeur artificielle comparable en tous points à un véritable cancer. D'origine épithéliale — spinocellulaire — elle se substitue presqu'entièrement au derme dans les parties — tiers supérieur de la face interne et tiers inférieur de la face externe — badigeonnées au goudron ; elle envahit le tissu connectif de la zone voisine de cette dernière région, *jamais goudronnée*, en en respectant à peu près partout la couche épidermique, et elle forme à distance trois petites métastases superficielles, chacune complètement isolée du foyer néoplasique primitif par la peau normale, qui l'en-toure, par le tissu connectif et le cartilage sur quoi elle est placée.

Ce qui frappe à l'examen des coupes microscopiques ce sont les altérations des éléments nerveux. J'en ai déjà donné précédemment la description ; on peut se rendre compte qu'elles sont encore plus marquées. Il semblerait que, si l'on admet avec Engel que le goudron agit premièrement sur la gaine à myéline, cette action se traduit par une atteinte consécutive des

cylindres-axes qui ne s'imprègnent plus qu'anormalement par l'argent ou même qui n'apparaissent plus s'il s'agit de fibrilles nues.

Ces altérations des nerfs correspondent à une hyperplasie des divers tissus des régions badigeonnées. On les retrouve dans la zone d'accroissement de la tumeur (cancer en cuirasse); dans les métastases isolées, la néoplasie ne concerne que les couches superficielles de l'organe, où, tout en ayant un caractère nettement épithéliomateux, le processus proliférant n'a pas encore conduit à une vraie dégénérescence cancéreuse des tissus sous-jacents.

Ce cas, dont une observation publiée antérieurement ne faisait pas prévoir l'évolution, doit être considéré comme celui d'une néoplasie cancéreuse avec métastases régionales, obtenue par le traitement approprié d'une oreille de lapin au goudron de houille brut.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1928

par JULES VIALA.

Pendant l'année 1928, 671 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur de Paris : aucune mort n'a été signalée.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	671
Mort	0
Mortalité p. 100.	0

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine :

ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100	ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100
1886	2.671	25	0,94	1908	524	1	0,19
1887	2.770	14	0,79	1909	467	1	0,21
1888	1.622	9	0,55	1910	401	0	0,00
1889	1.830	7	0,38	1911	341	1	0,29
1890	1.540	5	0,32	1912	395	0	0,00
1891	1.559	4	0,25	1913	330	0	0,00
1892	1.790	4	0,22	1914	373	0	0,00
1893	1.648	6	0,36	1915	654	1	0,15
1894	1.387	7	0,50	1916	1.388	3	0,21
1895	1.520	5	0,38	1917	1.543	4	0,26
1896	1.308	4	0,30	1918	1.803	3	0,16
1897	1.529	6	0,39	1919	1.813	3	0,16
1898	1.465	3	0,20	1920	1.126	6	0,53
1899	1.614	4	0,25	1921	998	1	0,10
1900	1.420	4	0,28	1922	754	0	0,00
1901	1.321	5	0,38	1923	727	0	0,00
1902	1.005	2	0,18	1924	764	1	0,14
1903	628	2	0,32	1925	782	0	0,00
1904	755	3	0,39	1926	634	0	0,00
1905	721	3	0,41	1927	639	0	0,00
1906	772	4	0,13	1928	671	0	0,00
1907	786	3	0,38				

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories :

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition entre ces catégories des personnes traitées en 1928 :

ANNÉE 1928	MORSURES à la tête			MORSURES aux mains			MORSURES aux membres			TOTALS		
	Traitées	Morts	Mortalité p. 100	Traitées	Morts	Mortalité p. 100	Traitées	Morts	Mortalité p. 100	Traitées	Morts	Mortalité p. 100
Catégorie A. .	13	0	0	28	0	0	35	0	0	76	0	0
Catégorie B. .	9	0	0	415	0	0	84	0	0	208	0	0
Catégorie C. .	21	0	0	179	0	0	187	0	0	387	0	0
	43	0	0	322	0	0	306	0	0	671	0	0

Les personnes se répartissent de la façon suivante, d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

France.	664
Allemagne (armée du Rhin).	3
États-Unis	1
Grèce	1
Indes anglaises	1
Roumanie	1

Répartition par départements des 664 personnes traitées mordues en France.

Aisne.	7	Aveyron	17
Allier	5	Calvados	10
Ardennes	2	Cantal	3
Aude.	1	Charente-Inférieure	2

Corrèze	3	Meuse	1
Côte-d'Or	3	Morbihan	5
Côtes-du-Nord	10	Nièvre	2
Creuse	14	Nord	1
Doubs	3	Oise	5
Eure	4	Orne	8
Eure-et-Loir	2	Pas-de-Calais	1
Finistère	3	Puy-de-Dôme	13
Garonne (Haute-).	3	Pyrénées (Hautes-).	1
Gironde	4	Rhin	1
Hérault	1	Rhin (Bas-).	5
Ille-et-Vilaine	24	Rhône (Bouches du-).	1
Indre	3	Saône-et-Loire	2
Indre-et-Loire	4	Sarthe	5
Loir-et-Cher	1	Savoie	1
Loire (Haute-).	1	Seine	318
Loire-Inférieure	11	Seine-et-Marne	8
Lot	4	Seine-et-Oise	60
Lot-et-Garonne	2	Seine-Inférieure	27
Maine-et-Loire	8	Sèvres (Deux-).	4
Manche	13	Somme	2
Marne	4	Vienne	7
Marne (Haute-).	4	Vienne (Haute-).	3
Mayenne	5	Yonne	2
Meurthe-et-Moselle	3		

Depuis 1911, l'Institut Pasteur a adopté la méthode de conservation en glycérine des moelles atténées, introduite dans la pratique par A. Calmette.

On se sert de pots-bans d'une contenance de 50 cent. cubes.

Dans chacun, on verse 25 cent. cubes de glycérine à 30° B⁶, *neutre*.

On stérilise à 120°, pendant vingt minutes.

On laisse refroidir et on introduit dans chaque pot-ban quelques fragments de moelles préalablement desséchées dans un flacon de potasse, d'après la méthode initiale de Pasteur.

Dans chaque flacon contenant la glycérine on met plusieurs fragments de moelle dont la longueur totale peut atteindre 5 centimètres.

On conserve ces flacons à la glacière aux environs de + 4°.

Pour éviter l'infection de la moelle chez les lapins paralysés et agonisants, on place ces derniers à même dans la glace.

Sitôt qu'ils sont morts, on extrait la moelle par la méthode

d'Oshida, au moyen d'un mandrin métallique nickelé stérile (1).

On n'utilise, pour la vaccination des personnes mordues, que des moelles ayant séjourné moins de vingt jours en glycérine, l'expérience ayant montré que le degré d'atténuation de chaque moelle n'est pas sensiblement modifié pendant les vingt premiers jours.

Le virus fixe de passage actuellement utilisé est le même que celui dont on s'est toujours servi depuis la création du service de vaccinations antirabiques, d'abord rue d'Ulm, et ensuite (à partir de 1888) à l'Institut Pasteur.

A la date du 1^{er} mars 1927, il portait le n° 1314.

Il convient de signaler que, depuis le 19 août 1911, les inoculations de passage du virus fixe sont toujours effectuées, non plus avec le bulbe frais de lapin rabique, mais avec le bulbe conservé depuis au moins quarante-huit heures en glycérine à la glacière.

Depuis que cette technique a été adoptée, nous n'avons jamais constaté de modifications dans les délais d'incubation de la maladie après inoculation sous la dure-mère, et aucun incident (paralysie ou autre) n'a été observé chez les mordus qui ont suivi le traitement.

Nous reproduisons ci-après le schéma des traitements suivis par les mordus, suivant la gravité de leurs morsures.

Injections antirabiques.

1 ^{er} jour	Moelle de 5 jours	
2 ^e —	— 5 —	
3 ^e —	— 4 —	
4 ^e —	— 4 —	
5 ^e —	— 3 —	
6 ^e —	— 3 —	
7 ^e —	— 4 —	
8 ^e —	— 3 —	
9 ^e —	— 2 —	
10 ^e —	— 4 —	3 cent. cubes
11 ^e —	— 3 —	
12 ^e —	— 2 —	
13 ^e —	— 3 —	Morsures
14 ^e —	— 3 —	
15 ^e —	— 2 —	légères.

(1) Ces mandrins (modèle de Jules Viala) sont construits par la fabrique d'instruments de chirurgie Collin, rue de l'École-de-Médecine, à Paris.

16 ^e jour	Moelle de 4 jours	3 cent. cubes
17 ^e —	— 3 —	Morsures
18 ^e —	— 2 —	multiples.
19 ^e jour	Moelle de 3 jours	3 cent. cubes
20 ^e —	— 3 —	Morsures
21 ^e —	— 2 —	graves.
22 ^e jour	Moelle de 3 jours	3 cent. cubes
23 ^e —	— 3 —	Morsures
24 ^e —	— 2 —	à la tête.
25 ^e —	— 2 —	

Le Gérant : G. MASSON.

